

283817

3

Hacettepe Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Biyokimya Bölümü

**SİĞİR BEYİNİ ACETYLCHOLINESTERASE'İ SAFLAŞTIRILMASI
VE
BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ**

Kim. Y. Müh. Kaya Emerk

Doktora Tezi

1 9 7 0

73

Hacettepe Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Biyokimya Bölümü

SIĞIR BEYİNİ ACETYLCHOLINESTERASE'I SAFLAŞTIRILMASI
VE
BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ

Kim.Y.Müh. Kaya Emerk

Doktora Tezi

1970

İ Ç İ N D E K İ L E R

ÖZET	1
GİRİŞ	2
MATERYAL ve METODLAR	6
Beyin Temini	6
NEP Hazırlanışı	6
Aktivite Tayin Metodu	7
Dish Elektroforezi	12
Density Gradient	12
Protein Analizleri	13
SONUÇLAR	14
Saflaştırma	14
Özet Tablosu	30
Katalitik Özellikler	31
TARTIŞMA	44
REFERANSLAR	48

ÖZET

Sığır Nucleus Caudatus'undan Acetylcholinesterase (Acetylcholine hydrolase E.C.3.1.1.7.) akrilamid elektroforezinde ve density gradient santrifügasyonunda tek bant verecek seviyede saflaştırılmıştır.

Saf enzimin biokimyasal özellikleri, kinetik karakteri incelenmiş, enzimin allosterik olduğu gösterilmiştir. Enzim özellikle okzalasetat ve sitrat tarafından aktive edilmektedir. Bu bulgunun sinir iletimi fizyolojisi bakımından tartışması yapılmıştır.

GİRİŞ

Son yıllarda yapılan araştırmalar hücre zarlarının bir çok kompleks enzimatik reaksiyonun cereyan ettiği mozaik yapıda lipoprotein kompleksleri olduğunu ortaya koymuştur. (1)(2)(3). 100 Å kalınlığında olmasına rağmen son derece karışık ve spesifik yapılar gösteren zarlar sistemi ve bilhassa uyarılabilen zarların özellikleri araştırmacılar için daima çekici bir saha olmuş, fakat bu konuda çok az malumat elde edilebilmiştir. Yalnız bugün biliyoruz ki, bazı zarlar permeabilitelerini rapid ve reversibl olarak değiştirebilmekte ve bunun sonucu olarak meydana gelen iyon hareketleri bioelektrik akımların temelini teşkil etmektedir.(4) Sinir impuslarının sinir ve adele fibrilleri boyunca iletimini sadece bu derece fizikî bir olayla izah etmek meydana gelecek ısı olaylarını ağıklamaktan uzaktır. Bundan dolayı bir takım kimyasal olayların permeabilite değişikliği ile elele gittiğini kabul etmek gerekir. Enzimlerin ve proteinlerin hücre faaliyetlerindeki rolleri gözönüne alınırsa, permeabilite değişiklikleri ve dolayısı ile bioelektrik akımları geçmesinde de kimyasal olayları enzimlerin kontrol ettiği sonucuna varılabilir.

Asetilkolinesteraz asetilkolini spesifik olarak hidroliz eden membransal bir enzimdir. Nachmanshon tarafından evvelce ve bu çalışmada da gösterildiği gibi (5) katalitik özelliğinin geniş ölçüde sübstrat benzeri ve benzeri olmıyan bileşikler tarafından etkilenmesi, zarsal oluşu ile bu esteraz diğer klâsik esterazlardan çok farklı bir yapıdadır. Son yıllarda histokimyasal teknikler ve elektron mikroskopisi ile enzimin uyarılabilen zarlarda sinaps'ta lokalize olduğu, nonmyeline fibrillerde mevcut bulunduğu tespit edilmiştir. (5)(6)(7).

Bu bulgular, daha evvelce indirekt biokimyasal deneylerle bu enzimin iletimde rolü olduğuna dair ortaya atılan hipotezleri desdeklemektedir.

Bir çok araştırmacıların deneyleri asetilkolinin spesifik olarak sinir impuslarının iletiminde rol oynadığını ve membrandaki spesifik asetilkolin reseptörünün konformasyonunu değiştirerek zarın iyon permeabilitesini arttırdığını ortaya koymuştur. (8)

Her bir asetilkolin molekülünün parçalanması ile 40000 iyonun zarıdan geçtiği hesaplanmıştır. (9) Asetilkolinin hidrolizi ile zar tekrar eski konfigürasyonuna dönmekte ve iyon barajı tekrar kurulmaktadır. Bundan dolayı, asetilkolinin fonksiyonu ve metabolizması ile ilgili proteinler sinir impuslarının iletiminde en önemli rolü oynamaktadırlar.

Nitekim, son otuz yılda yapılan tecrübelerle dayanarak deliller sıralanacak olursa:

1) Asetilkolin ve onu sentez ve hidroliz eden enzimler (asetilkolinesteraz ve kolin O asetil transferaz) bütün hayvanlar aleminde iletim fibrillerinde lokaliz olmuştur. (10)

2) Asetilkoline spesifik bir enzim olan asetilkolinesteraz yukarıda belirtildiği gibi hem diğer esterazlardan çok farklı özellikler göstermekte, hem de bütün aksonların eksite edilebilen zarlarında sinir uçları zarlarında ve postsinaptik membranlarda lokalize bulunmaktadır.

3) Asetilkolinesteraz, asetilkolini birkaç mikrosaniye içinde hidroliz edebilecek kapasitededir. Yani, sinaps boşluğunda ve iletimde gözlenen hız ile hidroliz hızı aynı büyüklüktedir.

4) Torpedo, Elektrophorus balıklarının elektrik organında çok yüksek seviyede enzim aktivitesi bulunmuştur. Bu organlar, tabiatın yarattığı en kuvvetli elektrik üreticileridir ve fonksiyonları bakımından son derece özgüldürler.

Görev tipi itibarı ile de neuron'daki iletimi hatırlatır evsiftadır.(11)

5) Asetilkolinesterazın spesifik ve potent inhibitörleri elektrik akımını birçok sinir hücrelerinde tamamen bloke etmektedir.(12)

6) Organofosfatlarla muamele edilmiş aksonlarda elektrikî faaliyet tamamen bloke edilmişken, fosforile enzimi aktif hale geçiren piridin-2-aldoksinmethiodit ile elektrikî aktivite geri döndürülebilmektedir.(13)

7) Asetilkolinesterazdan farklı olduğu iddia edilen ve asetilkolin reseptör olarak isimlendirilen aksensal membranlardaki bir proteinin varlığı ileri sürülmüştür ve asetilkolinesterazdan farklı bir aktif merkezi olduğu iddia edilmiştir(16).

8) Asetilkolinreseptörün lipofilik inhibitörlerinin asetilkolin analogları olduğu tespit edilmiş ve bunların elektrikî faaliyetleri tamamen bloke edici özellikleri ortaya konmuştur.(5)

Bu arada, asetilkolin reseptörün ayrı bir enzim olmadığı, ve asetilkolinesterazın anyonik merkezinin bu işi gördüğü görüşü de yeni yeni yayılmaktadır.(15)

Kolinesterazların kinetik karakterlerinin incelenmesi, santral sinir sistemi iletim fizyolojisi bakımından önemli olduğundan bu konuda çalışmalar yapılmaktadır. Yalnız, kâfi derecede saf enzimin bulunmaması ve hazırlanan enzimlerin çabuk denatüre olması bu çalışmaları geciktirmiştir. Bilhassa memeli beyin asetilkolinesterazı bugüne kadar tatminkâr bir saflaştırma metodunun varolmaması sebebi ile çok az incelenmiştir. Elektroforus enzimi ile yapılan kinetik çalışmalar enzimin allosterik olabileceği fikrini uyandırmış, hakikaten de serum kolinesterazı olsun, eritrosit kolinesterazı olsun, allosterik özellikler göstermiştir.(16)(17)

Memeli beyin asetilkolinesterazının saflaştırması ve özelliklerinin tespiti, kolinerjik sinir impuslarının sinaptik iletiminin moleküler mekanizmasını aydınlatması bakımından ayrıca önem kazanmıştır.

Bu gün, asetilkolinesteraz hakkındaki bilgilerin büyük bir çoğunluğu elektroforuselektrikus'un elektrik organından saflaştırılmış enzime ve sıgır eritrosit zarı enzimine aittir.

Bu mevcut bilgiye dayanarak memeli asetilkolinesterazının uygun, tekrar edilebilir, güvenilir ve hakikaten saf protein veren bir metodla saflaştırılması yoluna gidilmiş ve böyle bir metod tezde teklif edilmiştir. Bu proteinin biokimyasal özellikleri sonuçlarda ve tartışmada belirtildiği üzere iletim fizyolojisine ışık tuttuğu bir karakter göstermiştir.

Memelilerde santral sinir sistemi enzimi için verilen saflaştırma metodları tatminkâr olmayıp, kristalizasyonu yapılabilmüş olan elektroforus enzimi saflaştırma metodunun muvaffak olmamış modifiye şekilleridir.(18)

Bu metodlardaki saflaştırma katları az olmakla beraber, enzim aktivitesi çok yüksek sübstrat konsantrasyonlarında ölçüldüğünden, spesifik aktiviteler çok yüksek olarak bildirilmiştir. Ayrıca bütün metodlar klâsik enzim saflaştırması metodları çerçevesinde verilmiştir. Yani, kolon kromatografisi, moleküler filtrasyon, absorpsiyon kromatografisi kullanılmıştır. Oysa, bizim çalışmalarımızın gösterdiği gibi enzimin kromatografi ile saflaştırılması aktif merkezinin lokalizasyonu ve polimerizasyon hızları bakımından enzim proteini için fizyolojik olmayıp, güvenilir değildir.

MATERYAL VE METODLAR

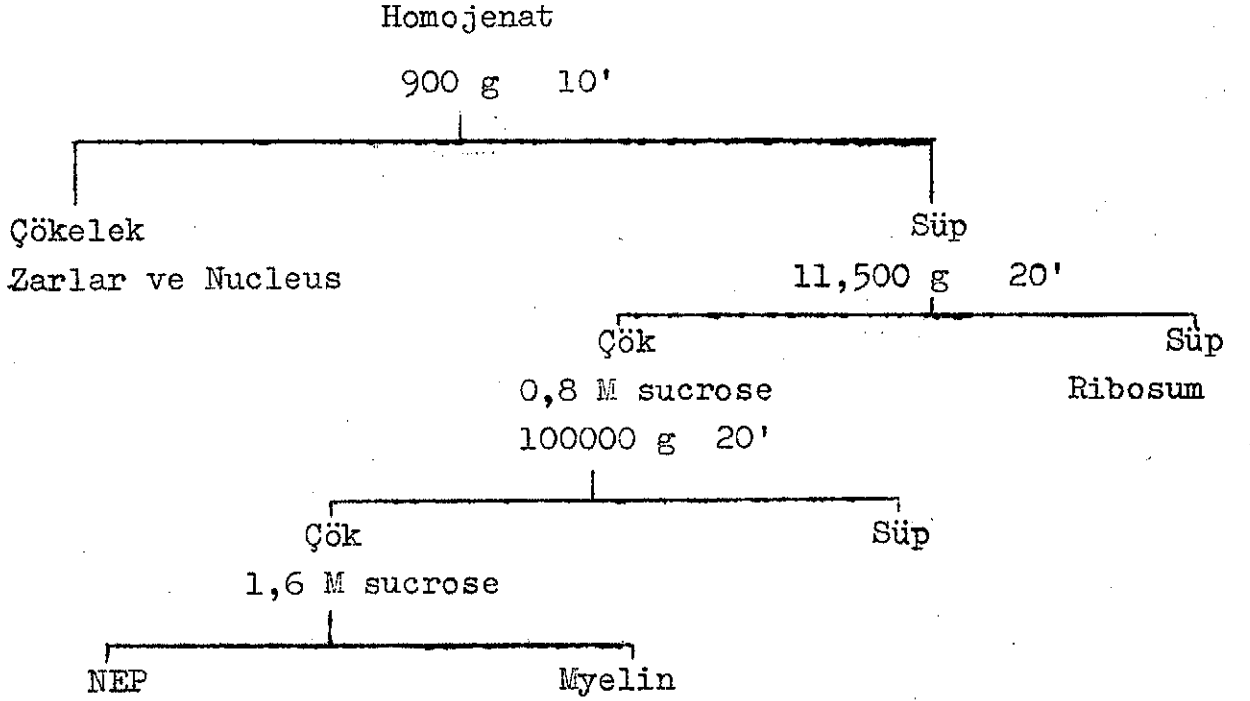
Beyin Temini:

Enzim pürifikasyonu için sığır beyni Nucleus Caudatus'u kullanıldı. motor kortekste bu bölgeden daha yüksek ünitede enzim olmasına rağmen, spesifik aktivite ve izolasyon zorlukları bakımından bu bölge seçilmemiştir. Sığırlar öldürüldükten sonra beyin 1-3 dakika içinde çıkarıldı ve buz talaşı içine alındı. Mezbahadan lâboratuvara getirildi. Kesimden sonra en geç 1,5 saat içinde kullanıldı. Kesimden sonra bir saat içinde soğukta hiçbir aktivite kaybı olmadığı tespit edildi. 2-3 saat sonunda %5 aktivite kaybı olduğu tespit edildi.

NEP Hazırlanışı: (19)

Nucleus Caudatus makasla keserek temizlendi, 1/10 w/v 0.32 molar sukroz içinde teflon homojenizatörde 8-10 defa aşağı yukarı bastırılarak homojenize edildi. 10 dakika 900 g'de +4°C'da santrifüj edildi. Çökelek atıldı. Süpernatant 11500 g'de 20 dakika santrifüj edildi . Süpernatant atıldı. Çökelek eş hacimde 0.8 molar sukrozla homojenize edildi 100000 g'de 20 dakika santrifüjlendi . Çökelek eş hacim 1.6 molar sukroz ile homojenize edildi 100000 g'de bir saat santrifüj edildi. Çökelekte NEP, ara süpernatanda diğer fraksiyonlar üstteki yüzen fazda myelin vardı.

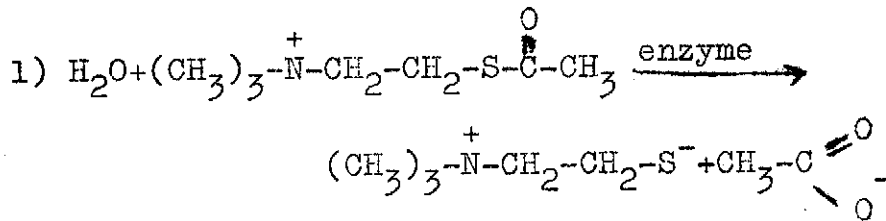
Preliminer deneyler bu preparatta yapıldı. Fakat, hazırlama esnasında aktivite kaybı fazla olduğu için solubilizasyon direkt olarak homojenattan yapıldı. Her iki metodla elde edilen spesifik aktivitelerde fark olmadığından ve ileriki saflaştırma yollarında bir fark yaratmadığından enzim NEP'den değil, total homojenatla çalışılarak saflaştırıldı.

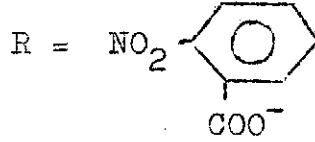
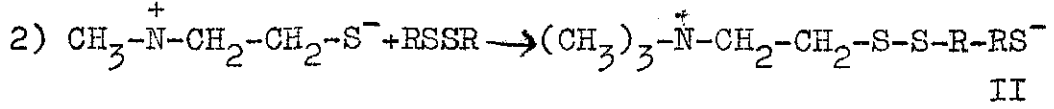


Bütün çalışmalarda iyonsuz su ve C.P. Grade materyal kullanılmıştır.

Aktivite Tayin Metodu:

Bütün tayinler G.L.Ellman metodu ile yapıldı.(20)
Sübrat olarak asetiltiokolin kullanıldı. Metodun prensibi hidroliz olan asetiltiokolinden açığa çıkan tiokolinin 5 5' dithiobis -2-nitrobenzoatın (DTNB) S-S bağıni redükliyerek meydana getirdiği bileşiğin tayini esasına dayanmaktadır.





II bileşiği sarı renkli olup, 412 mμ da absorpsiyon maksiması gösterir. 2. reaksiyonun hızı son derece rapiddir. Bundan dolayı tespit edilen hız sadece enzim hızıdır.

Bu metodla saflaştırma kademelerinin tayini için yapılan deneylerde 1-6 ve 2-7 dakikalar arasındaki hız alındı. Daha uzun zamanlarda tespit edilecek hızlar için azot atmosferinde çalışıldı. Zira, II bileşiği 40' dan sonra hassasiyeti azaltacak şekilde hava ile oksitlenmektedir.

Autoanalyzer deneyleri bu sebepten azot atmosferinde yapıldı. Azot Meites L ve Meites T metoduna göre (21) çinko amalgamı üzerinde %5 H₂SO₄ içinde %1 Vanadyl Sülfat çözeltisi içinden geçirilerek oksijeninden temizlendi. Teşekkülü mümkün H₂S kurşun asetat çözeltisi ile tutuldu. Silikajel ile kurutulduktan sonra kullanıldı.

Pürifikasyon kademelerinin takibi için tampon olarak pH=7.95 100 mM potasyum fosfat tamponu kullanıldı. Kinetik deneyler için ise başlıca sorbat ve sitrat tamponları kullanıldı. Nihai molariteler sitrat için 1-10 mM sorbat için 2-15 mM arasında tutuldu. Bütün deneyler pH=6.0'da yapıldı. Zira HCO₃⁻ anyonu enzimin aktivatörü olarak tespit edildi. pH=6'da bikarbonat teorik konsantrasyonu 10⁻⁵ molardan yukarı çıkmadığından optimum pH olarak 6.0 seçildi.

Süstrat olarak asetiltiokolin (ATK) kullanıldı. İyodür tuzu seçildi. Zira iyodürün nihai 25 mM'a kadar deaktive enzim üzerine hiçbir etkisi görülmedi.

DTNB (5 5' dithiobis-2-nitrobenzoat) pHmetre altında manyetik karıştırıcı ile bir saat içinde pH=6.0 oluncaya kadar potasyum hidroksit ile titre edilerek çözüldü. Titrasyon esnasında potasyum hidroksit son derece yavaş ilâve edildi. Çünkü, yüksek pH larda S-S bağının hidrolizi ile DTNB sararıp hassasiyetini kaybetmektedir.

Bütün tayinler sabit temperatürde Zeiss veya Beckmann DU spektrofotometresinde ve Autoanalyzer ile yapıldı. İlk hız için daima süstratın %5'inden azının hidroliz olduğu bölge seçildi. Zira, hız linearitesi yüksek hidroliz seviyelerinde bozulmaktadır.

Kör olarak daima enzim hariç diğer bütün reaktifleri aynı oranlarda pipetlenmiş olduğu küvetler kullanıldı. Enzim yerine aynı miktarda deiyonize su veya enzimin içinde bulunduğu tampon pipetlendi.

Saflaştırma kademelerinin rapid olarak takip edilebilmesi için aktivite tayininde kullanılan inkübasyon karışımı Spot Test olarak hazırlandı. Karışımda nihaî 0,1 mM ATK $2,5 \times 10^{-4}$ M DTNB, 0,1 M pH=7.95 potasyum fosfat tamponu mevcuttu. Bu karışım buz dolabında bir hafta hassasiyetini kaybetmeden dayanıklıydı. Enzim hızları 3 cc Spot Test'e 0.010 -0.020 cc enzim ilâve edilerek tespit edildi.

Tertiplenen kontrol denemeleri ile enzime büyük sayıda bileşiğin etki ettiği görüldü. Ortamdaki muhtemel aktivatör anyon ve katyonların tesirlerini minimal miktara indirebilmek için deney sistemleri süstrat ve renk reaktifinin total konsantrasyonu 10^{-3} M 'ı geçmiyecek şekilde seçildi.

Kinetik çalışmalarda en inaktif tampon olarak sorbat tamponu seçildi. Çünkü:

1) Diğer enzime çok az etkide bulunan 5,6 ve 7 karbonlu mono ve dikarboksilik asitlerinki ile mukayese edilebilir hızlar elde edildi.

2) pH= 6.0 civarında kuvvetli tampon özelliği gösterdi.

3) Aktivatör bileşiklerin aktivasyon gösterdikleri optimum konsantrasyonları çok altında konsantrasyonlar kullanıldığı zaman tespit edilen hızlara yakın hızlar gözlemlendi.

4) Sorbat 1-100 mM arasında kataliz hızında fark yaratmadı.

5) Sitratın ve klâsik aktivatörlerin aktivasyon ve mitelâz ve klâsik inhibitörlerin inhibisyon paternlerini ve yüzdesini değiştirmede.

Toluen butanol, eterle muamele edilmiş tozdan ekstre edilerek tekrar liyofilize edilen tozda yapılan protein tayinlerine göre % enzim proteini üzerinden alınan tartımlar 0.1 mg/cc -0.2 mg/cc arasında seçildi. Bütün kinetik deneylerde stok deaktive enzim dilüe edilerek 5-100 mikrogram protein/cc konsantrasyonda çalışıldı. Bu gaye ile 200-300 mikrogram/cc saf enzim deiyonize suya karşı +4°C 'da 5-7 saat süre ile 1/10000 oranında dializ edildi. 7 saatte enzim tamamen deaktive oldu , yani enzim sitrat ile tamamen aktive edilebiliyordu ve hız 0. dakikadaki hıza eşitti , fakat hiç denatürasyon görülmedi. Derişik preparatlarda ise enzim aşağıda tekrar tartışıldığı gibi polimerize olarak aktivitesini kaybetmekteydi.

Enzimin sübstratının bulunduğu aktivite tayininde kullanılan inkübasyon karışımında 1,5 saat müddetle 37°C'da denatüre olmadan yaşadığı tespit edildi.

Muhtelif sübstratlarla enzim aktivitesi ölçüldüğünde enzimin düşük sübstrat konsantrasyonlarında asetiltiokolin'e affinitesinin asetilkoline olan affinitesinden çok düşük olduğu bulunmuştur. Sadece , 2,5 milimolar ile 7,5 milimolar arasındaki bölgede asetiltiokolin asetilkolin'den daha iyi bir sübstrat gibi davranmaktadır. (Şekil 1) Asetilkolin ile yapılan tayinlerde Hestrin tarafından teklif edilen hidroksilamin hidrolizine dayanan tayin metodu (28) pratik ve güvenilir olmadığından sübstrat olarak hidroliz hızı çok hassas ve kolay ölçülebilir olan asetiltiokolin (ATK) kullanıldı.

Enzim hızları ünite üzerinden verilmiştir. Ünite 1 miligram proteinin 37°C'da pH=6'da 1 saat içinde hidroliz ettiği ATK mikromolü olarak tarif edilmektedir.

Bütün Zeiss ve Beckmann analizleri en az ikili veya üçlü yapılmıştır.

Autoanalytic Sistem: (Şekil 2)

Autoanalyzer deneyleri için enzim bir önceki şartlarda dializ edildi, dializ sonunda yapılacak deney sayısı kadar tüplere uygun miktarlar bir kerede pipetlendi. Buz banyosuna kondu. İnhibitör deneyleri için kullanılacak olan inhibitörler tampon içinde hazırlandı ve 10 dakika +4°C'da enzimle preinkübe edildi. Bunun sebebi eserin'le gözlenen inhibisyonun ağır ağır husule geliyordu. Mitelaz ile inhibisyon süratle, aynı ölçüde teşekkül ediyor ve devamlı olarak kalıyordu.

Deneyden önce kullanılacak sübstrat konsantrasyonunun totali saf pseudocholinesterase ile 30 dakika inkübe edilerek verdiği total renk tespit edildi. Aynı konsantrasyonda yapılan bütün deneyler için enzim 15 dakikada +37°C'da total rengin %5'inden az renk verecek şekilde sulandırıldı.

Nümune tablosunda dizilen herbir nümuneden sonra 2 adet %0.08'lik Brij çözeltisi ihtiva eden küvet ile 2 adet deiyonize su küveti kondu. Bilhassa yüksek asetiltiokolin konsantrasyonlarında ürünlerle kontaminasyondan dolayı Beackground yükselmesi bu tedbirle tamamen önlenmiş oldu.

Brij (polioksietilen-35-Lauryl ether) her ne kadar saflaştırma esnasında denendiğinde enzimi koruyucu olarak tespit edildi ise de, Brij ile yapılan kinetik hız kontrol deneylerinde %0.8'e kadar aktivasyon, deaktivasyon ve inhibisyon üzerine Brij'in hiçbir etkisi bulunmadığı tespit edildi. Ayrıca sona konan 2 adet su küveti de bulaşan Brij'i temizlemeye yetti.

Asetiltiokolin DTNB ve tampon-modifier karışımına enzim ilâve edilir edilmez $+2^{\circ}\text{C}$ 'da tutulan karıştırma kolonuna verildi. Bu tedbir, bir dakikalık karışma esnasında minimal reaksiyon olması için alınmıştır. Soğuk karışım 3 saniye içinde 37°C 'lık banyoya gönderildi. Ve 15 dakika inkübe edildikten sonra kolorimetreye sevk edildi.

Deney sisteminin aynı ile tekrar edilme özelliği araştırıldı. (Şekil 3a). Standart hata ± 0.005 O.D. standart sapma ise ± 0.0015 O.D. olarak bulundu.

Enzim stokiyometresi için yapılan kontrol deneyinde (Şekil 3b) enzim 1; 2/3; 1/3; 1/6 sulandırılarak yapıldı. Nümune tablosu diğer bütün deneylerde olduğu gibi nümune + Brij + Brij + su + su olarak dizildi. Şekilden de görüldüğü gibi sonuçlar tatminkâr bulundu.

Disk elektroforezi ve boyanması %7 akrilamid jeli üzerinde Davis ve Ornstein metoduna göre $\text{pH}=9.2$ 'de tris-glisin tamponunda yapıldı. (22). Elektroforezin sonu Bromfenol mavisi bandının lokalizasyonu ile tespit edildi.

Density Gradient analizleri %5-%20 sukroz gradieninde yapıldı (23). (Schachmann Biochemistry 2: 887:1963) Beckmann L-2 D analitik ultrasantrifüjünde SW39 tipi rotorla 39000 rpm'de $+4^{\circ}\text{C}$ 'da 8 saat santrifüj edildi. 0.15 cc lik 28-30 fraksiyon toplandı. Mukayese proteini olarak saflaştırılmış ve iki kere kristallendirilmiş Sigma katalazı ve saflaştırılmış plazma albümini kullanıldı. Bovine plazma albümini DEAE sellülozdan geçirildi, ve ana fraksiyon olan ikinci protein zirvesi kullanıldı. Bovine plazma albumininin ve katalazın saflığı akrilamid jel elektroforezi ile ayrıca kontrol edildi. Santrifüj tübünün dibini delinmek sureti ile toplanılan nümunelerde protein analizleri Folin Chiocolteau metodu ile yapıldı. (24) Enzim aktivitesi tayini için normal Spot Test , katalaz aktivitesi için H_2O_2 ; KmnO_4 metodu kullanıldı. (25)

Protein Tayinleri:

Pürifikasyonun muhtelif kademelerinde mevcut protein konsantrasyonlarına göre, seçilen en uygun metod kullanıldı. Kolon elüatları 260-280 milimikron'da yapılan okumalar ile Warburg formülüne göre hesaplandı. (26)

$$(1,55(O.D._{280}) - 0,76(O.D._{260})) \times \text{sulandırma} = \text{mg/cc protein}$$

İlk homojenatta protein Biüret metodu ile tayin edildi.(39) Background okumaları potasyum siyanür ilâvesi ile renk sol-
durulduktan sonra yapıldı ve bu suretle bulanıklığın yarattığı komplikasyon önlenmiş oldu. Bu metodun bu kademe de seçilmesinin sebebi hem yüksek protein konsantrasyonları ile iyi netice vermesi, hem de belirtildiği gibi bulanıklığın kolayca ölçülebilmesiydi.

Amonyum sülfat fraksiyonlarında protein tayinleri 260-280 milimikron analizi ile yapıldı. Zira, yüksek konsantrasyonda amonyum sülfatın diğer bütün protein tayin metodlarına az da olsa arttırıcı yönde etkisi bulunduğu tespit edildi.

Santrifüj sonrası ve organik çözücülerle yapılan selektif denatürasyon sonrası numunelerde mevcut düşük protein konsantrasyonlarını tayin için Folin Chiocolteau metodu kullanıldı(26) . Bu metodu hem hassasiyeti, hem de bazik ortamda mevcut proteinler için iyi neticeler verdiğinden seçildi.

DEAE , CM, ECTEOLA sellülozlar kromatografi için klâsik metotta rejenere ederek hazırlanmıştır. Brushite C 8 Alumina, kalsiyum fosfat jeli klâsik yollarla hazırlanmıştır.(27)

SONUÇLAR

I- Saflaştırma:

A) Solübilizasyon:

Homojenatın hazırlanışı: Sığır beyni Nucleus Caudatus'u kesimden sonra en geç 1,5 saat içinde makasla beyinden çıkarıldı. Bir kere +4°C'da çeşme suyu ile 2 kere +4°C'da deiyonize su ile yıkandı. Ufak parçalara kesildi ve tartıldı. Ağırlığının 5 misli hacim deiyonize su ile Teflon homojenizatörde soğukta homojenize edildi. 10000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi. Süpernatantla bütün solüble enzimler atıldı. Tekrar, 1/5 w/v +4°C'da deiyonize su ile yıkandı, 10 dakika 10000 rpm'de santrifüjlendi. Daha uzun ve çok sayıda yıkamalar hem sonraki solübilizasyon verimini düşürmekte, hem de aktivite kaybına sebep olmaktadır.

İkinci yıkamadan kalan çökelek, başlangıçtaki Nucleus Caudatus ağırlığının 10 misli hacimde, 5 milimolar pH=6.0 Citrate tamponu ile Teflon homojenizatörde homojenize edildi. 37°C'da, 4 saat karıştırıcı altında solübilizasyon için ısıtıldı. 4 saat sonunda bütün malzeme 40 dakika 10000 rpm'de +4°C'da santrifüj edildi. Süpernatant soğukta amonyum sülfat kesiti için saklandı. Bu kademede dondurmak enzimi denatüre ettiğinden mahzurludur. Bu kademede ortalama 10 kere saflaşma elde edildi, verim %45-50 civarındadır.

Muhtelif solübilizanlarla yapılan kontrol denemelerinde şu bilgiler elde edildi:

a) Deeksicholate , sodyum lauryl sülfat ve benzeri zar ve lipid çözücüler mutata olarak kullanıldıkları konsantrasyonlarda enzimi %100 denatüre ettiler.

b) Muhtelif deterjanlardan denenen Triton X 100, Triton N 101, Triton DF 12, Triton QS 15, Tween 80 ve Tween 20 verim ve müteakkip kademelerde spesifik aktiviteyi arttıracak olumlu sonuç vermedi.

Yalnız, polioksietilen lauryl ether (Brij) enzimi yüksek verimle (%80-82) solübilize etti. Ancak, sonradan dializ ile Brij'in ortamdan uzaklaşması ile enzim aktivitesini kaybetti, daha kolay denatüre olma meyli gösterdi. Aynı zamanda Brij'le solübilizasyon amonyum sülfat kesitinde pratik zorluklara yol açtığından bu deterjanın kullanılmasından vazgeçildi.

NEP (Nerve Ending Particles) izolasyonu ile saflaştırmaya başlanan deneylerde verim çok düşüktür. Zira, NEP elde ederken, hem aktivite az bir miktarda da olsa muhtelif fraksiyonlara dağılmakta, hem de metodun uzunluğu, pratik olmayışı ve metod sonrasında sukrozu ortamdan uzaklaştırma güçlüğü bu yolun seçilmemesi sebepleridir.

B) Amonyum Sülfat Kesiti:

Süpernatant buz banyosunda devamlı karıştırılarak susuz amonyum sülfatla %17,5 saturasyona getirildi. 30 dakika daha karıştırıldı, 10 dakika sakin bekletildikten sonra 10000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. İnaktif çökelek atıldı. Süpernatant amonyum sülfat ile buz banyosunda karıştırılarak %57 saturasyona getirildi ve hemen 10000 rpm'de 15 dakika santrifüjlendi. Aktif çökelek minimal hacimde 5 milimolar pH= 6 sitrat tamponu ile emülsiyon haline getirilerek dializ torbasına aktarıldı.

Deterjanlarla(Brij, Triton, Tween v.s.) solübilize edilmiş preparatlarda amonyum sülfat kesiti profili değişmedi; ancak çökelekler yüzdüğünden toplanma zorlukları gözlemlendi.

Bu kademedeki verim %75'dir. Yaklaşık üç kere saflaştırma elde edilmektedir. Amonyum sülfatla saflaştırılmış enzim amonyum sülfat uzaklaştırılmadıkça soğukta bir hafta kadar dayanıklıdır.

C) Liyofilizasyon:

Nümuneye 3 kere 1/1000 hacim oranında 5 milimolar pH=6.0 sitrat tamponuna karşı 18 saat dializ edildi. Dializ sonunda 26000 rpm'de +4°C 'da ultrasantrifüj'de 40 dakika santrifüj edildi. Süpernatant alttaki yumuşak tabaka yerinden oynatılmadan toplandı. Liyofilizasyon balonu içinde asetonlu karbondioksit karışı ile ince bir tabaka halinde donduruldu, ve liyofilize edildi. Kuru toz vakumda silikajel üzerinde saklandı. Enzim en fazla bu kademede dayanıklı olup, 4-6 hafta içinde aktivite kaybı ancak %5 olarak tespit edildi.

D) Enzimin Selektif Ekstraksiyonu:

Kurutulmuş tozdan alınan uygun tartımlar ağırlığının 20 misli hacimde toluen içinde cam homojenizatörle iyice homojenize edildi. 70°C'da su banyosunda karıştırılarak 3 dakika ısıtıldı. Derhal buz banyosunda önce 0°C'a getirildi, sonra -20°C'da 15 dakika bekletildi. +4°C'da 3000 rpm'de 15 dakika santrifüjlendi. Toluene fazı atıldı. Dipteki yağ çökelek aynı hacim kurutulmuş distile butanol ile karıştırıldı. 1,5 dakika 70°C'da ısıtıldı ve derhal önce 0°C'a soğutuldu, sonra -20°C'da 15 dakika bekledi. +4°C'da 3000 rpm de santrifüj edildi. Yağ çökelek soğuk anhidr peroksitsiz distile eterle yıkandı. +4°C'da 15 dakika 3000 rpm'de santrifüjlendi. Çökelek 10⁻⁵ milimetre vakumda kurutuldu.

Tozdan alınan örneklerde yapılan protein tayinlerine göre belirli miktarda toz çözüldüğünde ortamda 0.5 miligram/cc protein verecek şekilde +4°C'da pH=5,5 5 milimolar sitrat tamponu ile homojenize edildi. 11000 rpm'de 10 dakika santrifüjlendi. Süpernatant 1 damla yüksek molaritede pH=6.2 sitrat tamponu ile pH=6'ya getirildi. Enzim pH=5,5'da dayanıklı değildir, ancak bu pH'da optimum verimle protein ve en yüksek spesifik aktivitede

enzim ekstrakte edilmektedir. Hazırlanan ekstrakt derhal yukardaki şartlarda liyofilize edilerek kurutuldu. Silikajel üzerinde -20°C 'da bir hafta dayanıklı olduğu tespit edildi.

Ekstrakte edilen enzim derhal liyofilize edilmezse aşağıda izah edildiği gibi süratle natif karakterini kaybetmektedir.

Ekstraksiyon kademesi enzimin biokimyasal özelliğinin incelenmesi bakımından en kritik anı teşkil etmektedir. Enzim son kurutulan tuzdan derişik olarak çözüldüğünde süratle aglomerize olmakta ve hem çözünlük, hem akrilamid'e göç, hem de kinetik özellikleri dolayısı ile değişmektedir. Şekil 4'de gösterildiği üzere iki ayrı konsantrasyonda enzim proteini çözüldüğünde kesif preparat süratle süstratına affinitesini kaybetmekte ve bu gözlem bulanıklığın artması ile paralel gitmekte iken, sulandırılmış olarak çözülen enzimde bulanma olmamakta ve enzim natif karakterini muhafaza etmektedir. Optimum konsantrasyon olarak 100-200 mikrogram/cc enzim proteini tespit edildi. Kinetik deneyler için evvelce belirtildiği gibi önce yukarki konsantrasyonda hazırlanan stok enzim deaktive edildi, sonra kullanıldı.

Ekstraksiyon için muhtelif deterjanlar denendi, fakat bu kademedede spesifik aktiviteyi arttırıcı hiçbir etkileri gözlenmedi.

Organik çözücü olarak Heptan, Hekzan, Propanol, Aseton, Etanol, Etilasetat, Dioksan, Glikokol denendi. Gerek verim gerekse nihaî spesifik aktivite bakımından, bu çözücülerin hiçbiri uygun bulunmadı.

Bu kademedede verim %52 saflaştırma 1.6 kere bulundu.

Polimerleşme olayının fizikokimyası etraflı tetkik edilemedi. Ancak, uygun konsantrasyonda çözülen enzime 0.5 miligram/cc Bovine Plazma Albumini ilâve edildikten sonra Sephadex G-200 kolonundan geçirildiğinde beklendiği gibi 2 ayrı zirve elde edilemedi. Albumin de enzimle birlikte "Void" hacimde elüe edildi. Böylece yüksek protein konsantrasyonlarında gözlenen bulgu ; enzimin aglomerasyon eğilimi bir diğer protein kullanılarak da gösterilmiş oldu. Nitekim aynı olay yani, iki ayrı zirvenin kaybolması ve tek zirvenin çıkışı akrilamid jel elektroforezinde de gözlemlendi.

Süstitüe selülozlarla (DEAE, CM, ECTEOLA) yapılan absorpsiyon kromatografisi deneyleri olumsuz sonuç vermiştir. Enzimin selülozlara aktif merkezlerinden bağlandığı bulunmuştur. Bunun için DEAE selüloz ihtiva eden kolonlar 5 milimolar pH=6.0 citrate tamponu ile 3 ayrı asetilkolin konsantrasyonunda (50 mM, 5 mM, 0.5 mM) ekilibre edildi. Enzim kolona tatbik edilmeden hemen önce aynı konsantrasyonda asetilkolin ile karıştırıldı ve hemen kolondan geçirildi. Yüksek konsantrasyonda asetilkolin ile ekilibre kolonda enzim selüloza tutulmadı. Asetilkolin konsantrasyonu azaldıkça , enzimin selüloza tutulması kolaylaştı, ancak 1 molar tamponla bile enzim kolondan elüe edilemedi. Aynı sonuçlar asetilkolin yerine kolin kullanıldığında da gözlemlendi. Bu bulgular, enzimin DEAE selüloza asetilkolin veya koline özgül mahallinden (yahut mahallerinden) tutulduğunu ve bunun sonucunda selüloza yapıştığını telkin etmektedir. CM sellüloz, ECTEOLA selüloz ile de aynı gözlem tekrarlandı.

Brushite Celit, Bentonit gibi muhtelif kuvvette adsorbantlardan zayıf kudrette olanlar hiç bir saflanma vermedi. Enzim çoğu defa tutulmadı. Kuvvetli olanlarda ise enzim adsorbana aynen DEAE selüloza olduğu gibi yapıştı ve gene hiçbir şartla elüe edilemedi.

Sephadex G-20-G200 arası muhtelif Sephadex'ler denendi. Pürifikasyonun ilk kademelerinde enzim ya büyük bir polimer protein kompleksi halinde "Void" hacimde çıkmakta idi.(Şekil 7) Yahut mevcut yabancı proteinlerle beraber elüe edilmekte idi. Sonraki kademelerde ise moleküler filtrasyon saflaştırma temin etmedi.

Saflaştırmanın her kademesi en az 20 kere tekrarlanmıştır. Saflaştırma kademelerinin ortalaması ve özeti Tablo I de gösterilmiştir.

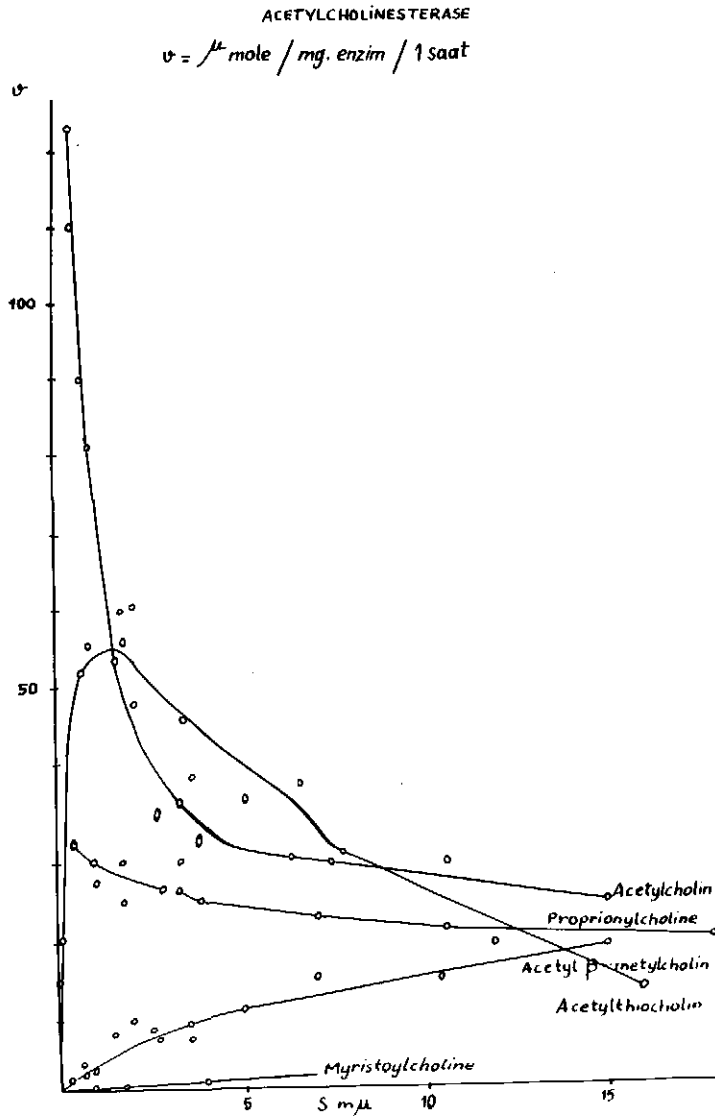
Enzimin orijinal ekstredeki pek çok bantdan saflaştırma sonunda tek bant halinde kalması en iyi akrilamid jel elektroforezi ile gösterilebilir. Şekil 5'de saflaştırmanın muhtelif kademelerinde gözlenen elektroforetik paternler takdim edilmiştir.

Enzimin molekül ağırlığı Density Gradient ile incelenmiş ve 100000 ± 19000 olarak hesaplanmıştır.(Şekil 6)

8 molar üre ile muamele edilmiş enzim 8 molar üre ile hazırlanmış akrilamid jeli üzerinde elektroforeze tabi tutulduğunda elektroforetik patern değişmemektedir. Bütün bu bulgular da enzimin elde edildiği gibi aktivitesini muhafaza eden en ufak ünitesinin hesaplanan molekül ağırlığında olduğunu telkin etmektedir.

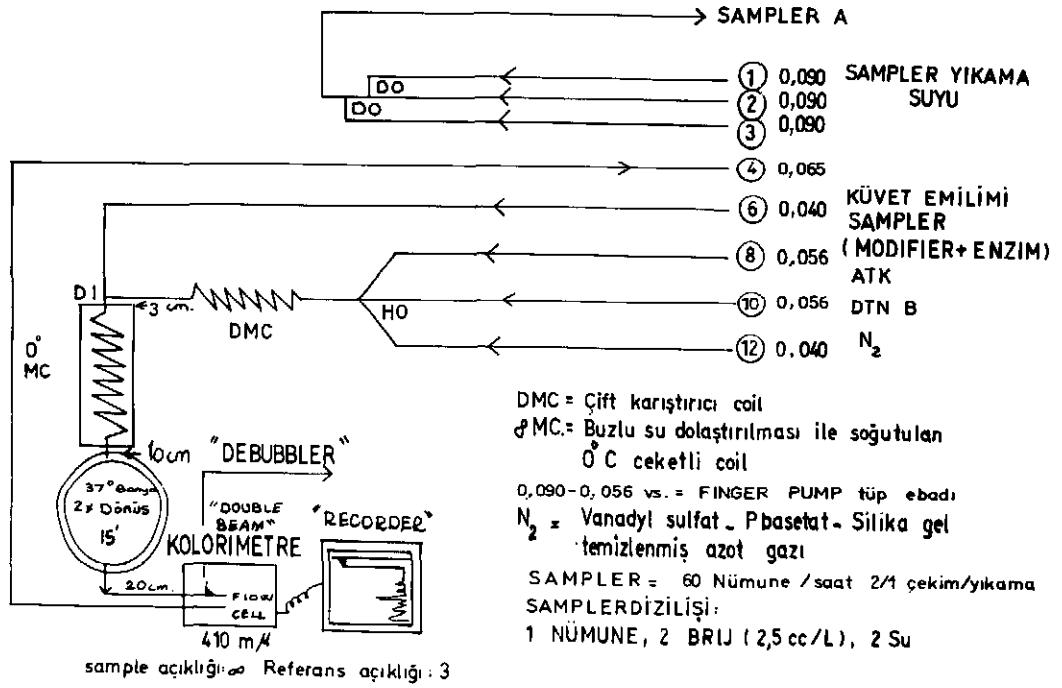
ŞEKİL I

Asetilkolinesterazın çeşitli sübstratlarla hızı .
Nucleus Caudatus homojenatı çeşitli kolin esterlerle inkübe edildi. İnkübasyon 10^{-1} M sodyum barbital içinde pH=8'de 37°C 'da muhtelif sürelerde yapıldı. Hidroliz hızı Hestrin metodu ile tayin edildi. (28) ATK kullanılan deneylerde 10^{-1} M pH=8 potasyum fosfat tamponu içinde 10^{-3} M DTNB ile 37°C 'da hidroliz takip edildi.



ŞEKİL 2

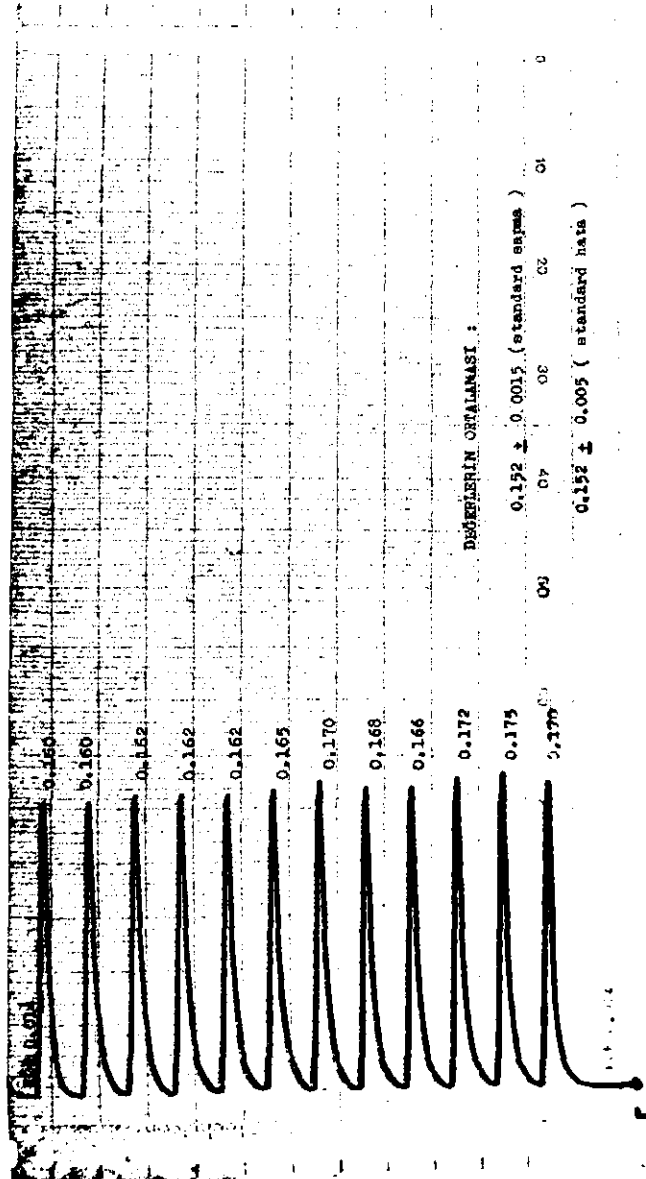
KULLANILAN "AUTOANALYZER" ŞEMASI: Sistemin özellikleri şemada belirtilmiştir.



ŞEKİL 3a

"AUTOANALYZER" KULLANILDIĞINDA DENEY GÜVENİLİRLİĞİ

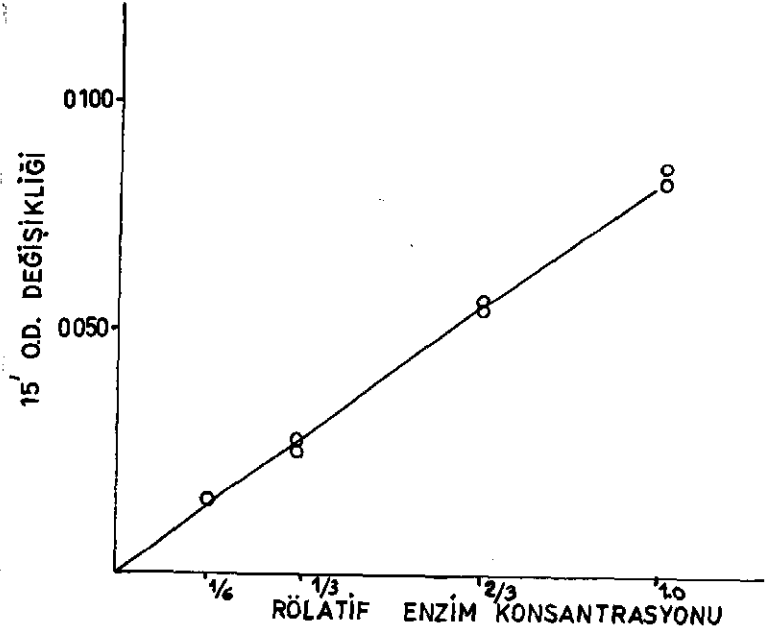
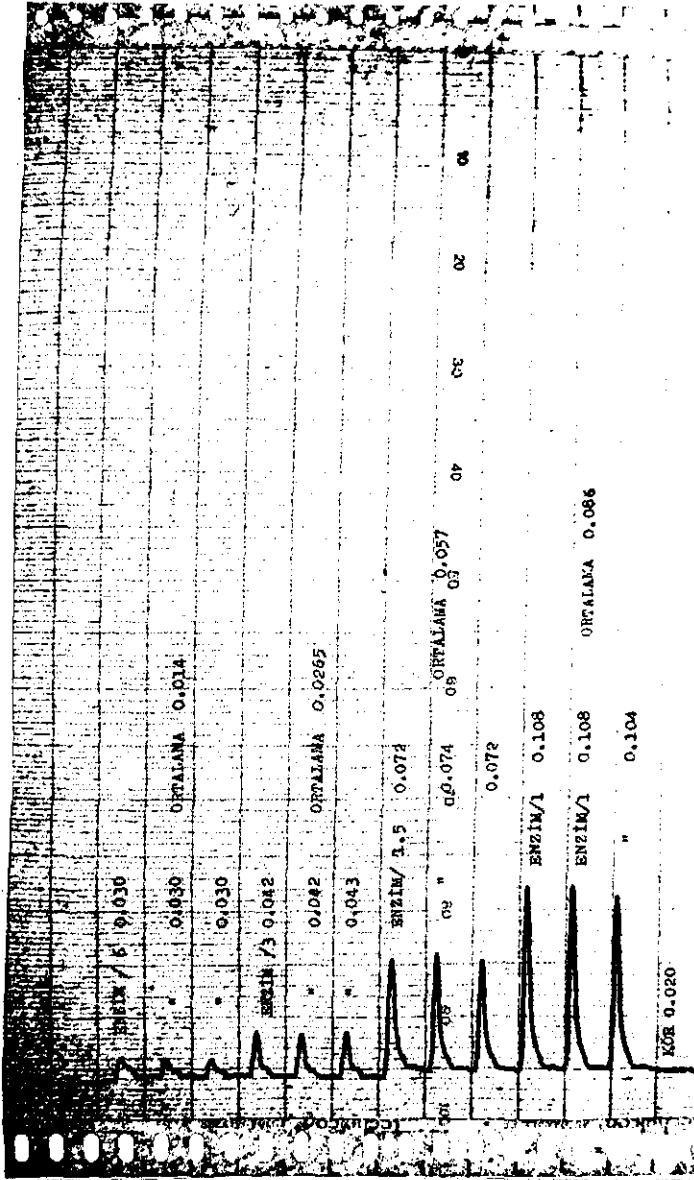
Deney şartları: Sorbat 10^{-3} M, ATK 4×10^{-5} M, DTNB 5×10^{-5} M, pH= 6.0 37°C ; banyo dolaşım zamanı 37°C 'da 15 dakika. Aynı enzim beşer dakika ara ile 12 defa denendi. Hidroliz sübstratın ilk %1 den azının parçalanması süresinde incelendi ve ilk hız bulundu. Değerlerin ortalaması, standard hata ve sapma verildi.



ŞEKİL 3b

ENZİM ASSAY'I STOYKIYOMETRİSİ

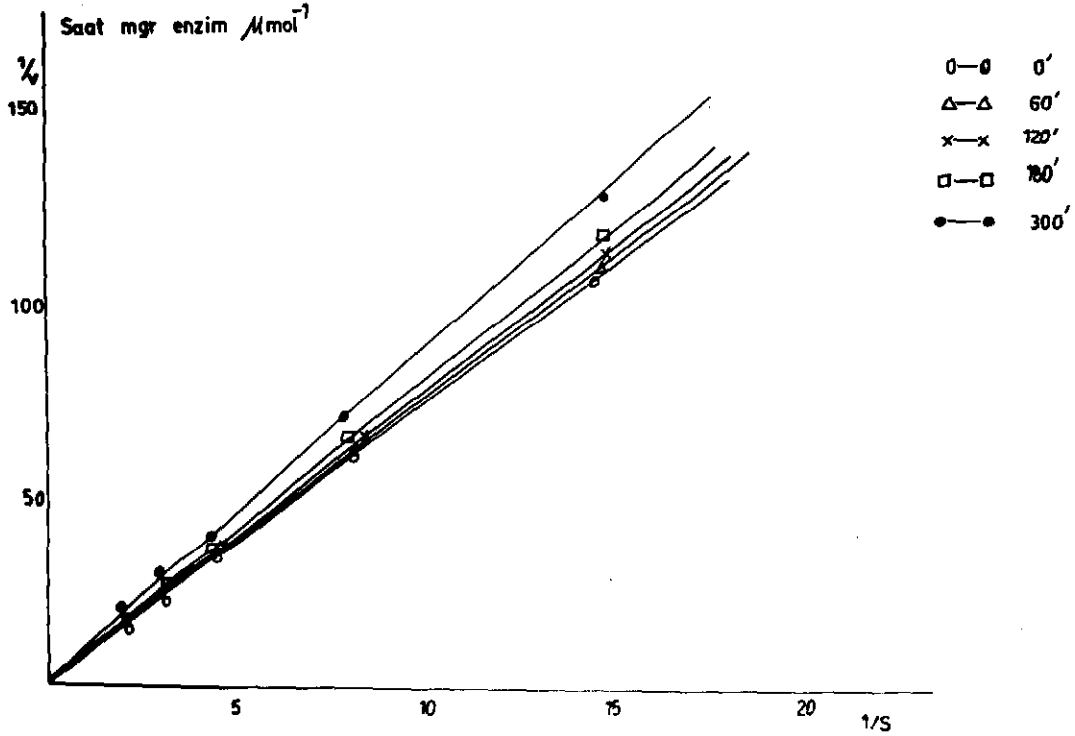
Deney şartları : Sorbat 10^{-3} M, ATK 8×10^{-5} M, DTNB 5×10^{-5} M pH=6 15 dakika 37° . Enzim su ile sıra ile 1/6, 1/3, 2/3 sulanmış ve sulandırılmadan çekilerek deney yapıldı. İlk hız tespit edildi.



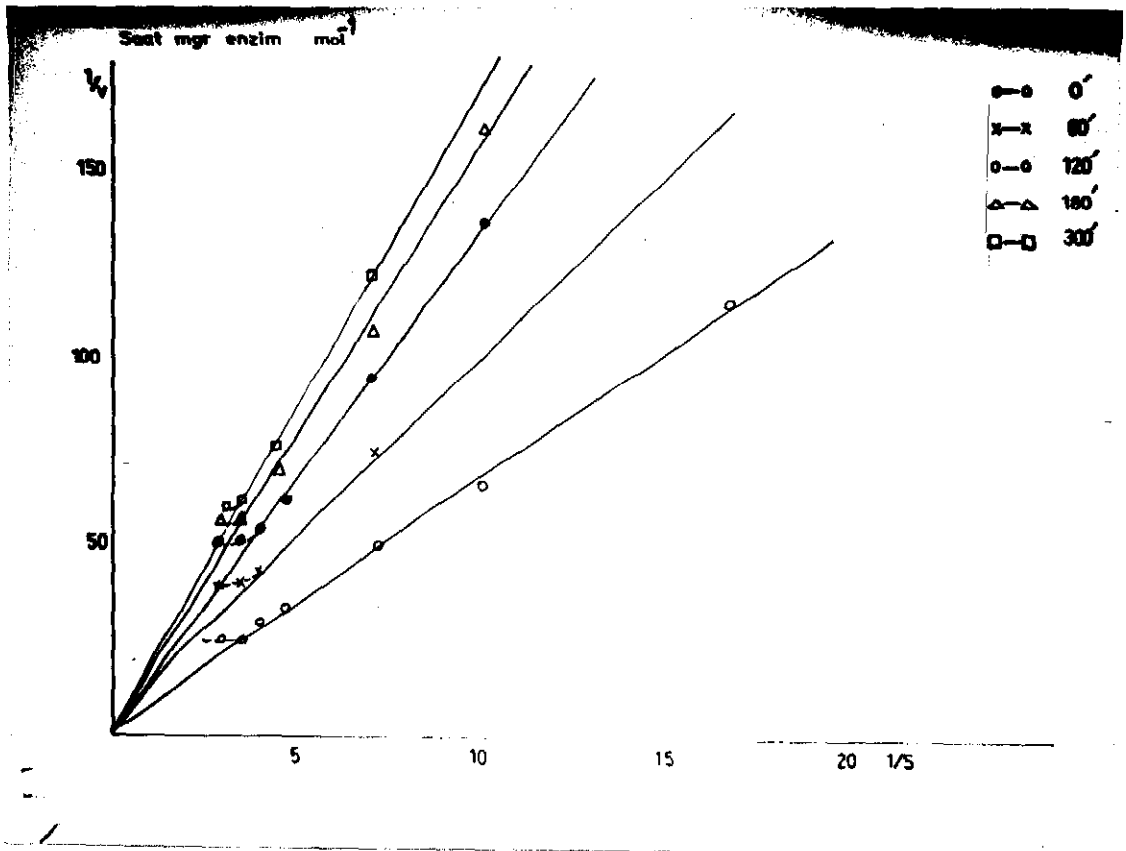
Absisde Rölative enzim konsantrasyonu, ordinatta O.D. olarak tespit edilen değer gösterildi.

ŞEKİL 4

A) 0.15 mg/cc enzim proteini ihtiva eden çözelti açık dialize kondu. +4°C'da deiyonize suya karşı 1/800 hacim oranında 5 saat dializ edildi. Muhtelif zamanlarda alınan numunelerde kataliz hızları ölçüldü. İnkübasyon karışımı 10^{-3} M sorbat, 10^{-5} M DTNB, ve 5×10^{-5} M ATK ihtiva etmektedir.



B) 0.75 mg/cc enzim proteini ihtiva eden çözelti açık dialize kondu. +4°C'da deiyonize suya karşı 1/800 hacim oranında 5 saat dializ edildi. Muhtelif zamanlarda alınan nümunelerde kataliz hızları ölçüldü. İnkübasyon karışımı 10^{-3} M sorbat, 10^{-5} M DTNB, ve 5×10^{-5} M ATK ihtiva etmektedir.

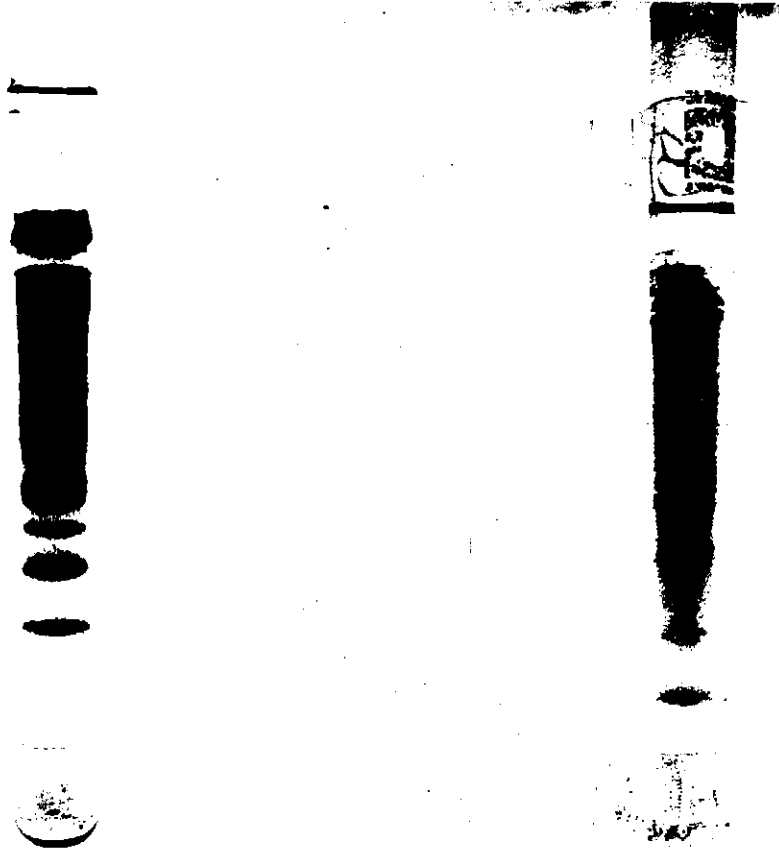


ŞEKİL 5

SAFLAŞTIRMANIN MUHTELİF KADEMELERİNDEN ALINAN
NÜMUNELERİN AKRİLAMİD JEL ELEKTROFOREZİ

Elektroforez %7 akrilamid üzerinde pH=9.2 Tris-Glisin
tamponu ile metodolojide bildirildiği gibi yapıldı.

- A) İlk homojenat,
- B) Solübilize süpernatant,
- C) %35 Amonyum sülfat çökeleği,
- D) Post santrifüj süpernatant,
- E) Son preparat





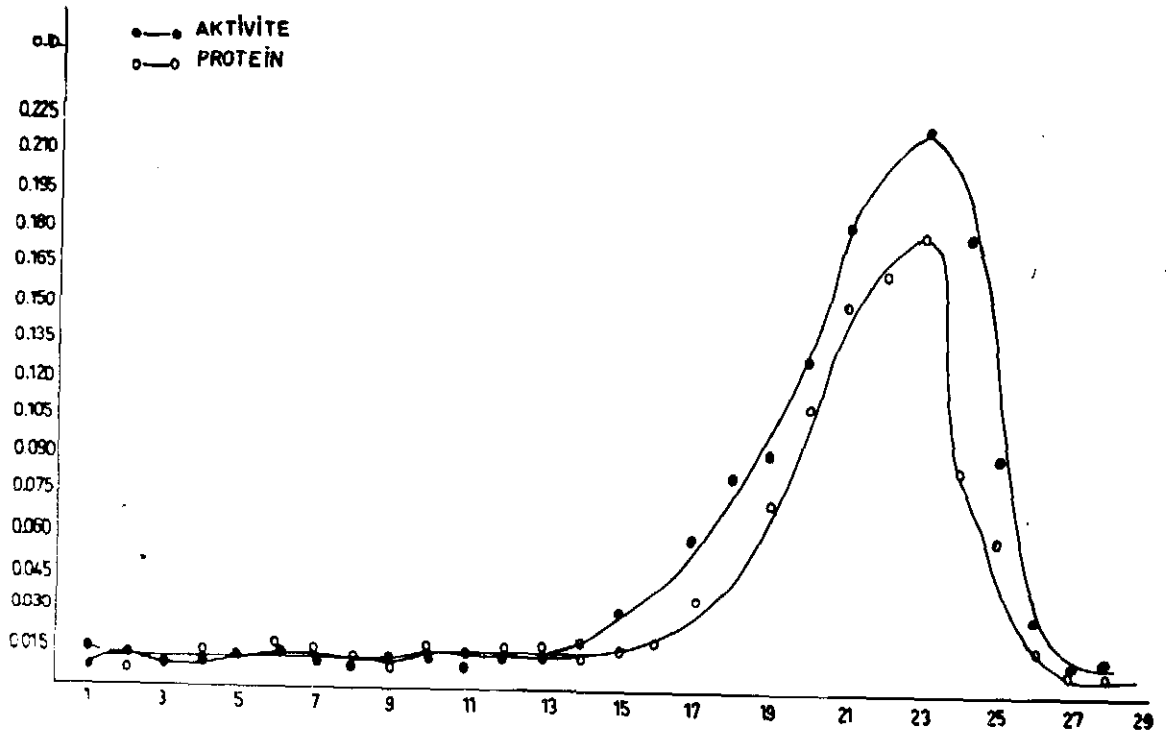
0141



ŞEKİL 6

DENSITY GRADIENT SANTRİFÜGASYONU ANALİZ SONUÇLARI

%5-20 sukroz gradyeni ile Beckmann L-2 D santrifüjünde SW39 tipi rotorla 8 saat +4°C'da yapıldı. 0.15 cc lik nünuneler tüpün dibinden itibaren toplandı. Tayinler metodolojide belirtildiği gibi yapıldı.

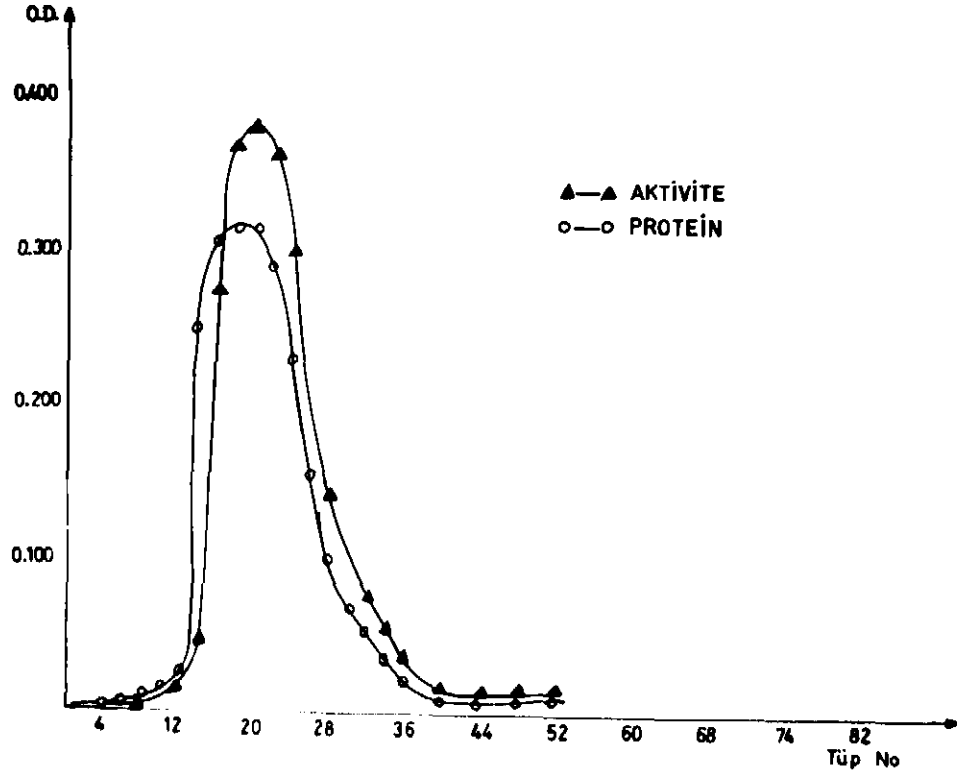


ŞEKİL 7

SEPHADEX G-200 KOLONU ANALİZİ

Aktivite tayinleri metodolojide bildirildiği gibi normal Spot Test ile yapıldı. 5 dakikadaki optik dansiteler bildirildi.

Protein tayinleri 260-280 m μ okumaları ile yapıldı.



TABLO I

ASEPTİKOLİNESTERAZ SAFLAŞTIRMASI ÖZETİ

Su ile	Miktar	ünite/ cc	Total ü	Prot mg/cc	Total protein	Sp. Ak.	Verim	Saflaşma
homojenat	300cc	340	102000	133,6	40080	2,54	%100,0	
Süp I (Yıkama)	170cc	39	6630	6,5	1105	6,00		
Süp II (Yıkama)	140cc	30	4200	2,7	378	10,00		
Çökeliğin Sitrattla Homojenatı	600	142	85.200	61.3	36.700	2.44	%83,5	x1
Süp II (Solü- bilize enzim)	480	87	41,760	4.31	2068	20,2	%49,0	x8,3
%10 AS süp	440cc	76	33,440	3,01	1324	25,2	%80,1	x1,3
%35 AS gök	50 cc	500	25.000	8,6	430	58.1	%74,8	x2.30
Post dializ	52 cc	400	20.800	8.4	430	47,6	%83,2	x1
Post santrifüj	47cc	340	16980	3,5	164	97,2	%81,6	x2.1
Post toluene+ butanol + eter	30cc	300	9.000	2.0	60	150	%53.0	x1,6
							%8.8	x84

II-Enzimin Katalitik Özellikleri

Enzimin sübstratı hidrolizi bir allosterik enzimdekine benzemek üzere hiperboliktir. Bu gözlem, şekil 8a'da gösterilmiştir. Enzimin hızı 5 mM ATK konsantrasyonuna kadar hiperbolik olarak artmakta, ondan sonra ileriki deneylerde de tartışılacağı gibi yüksek iyonik şiddet dolayısı ile yanlış olarak sübstrat inhibisyonu olarak adlandırılabilceği gibi bir miktar azalma gözlenmektedir.

Metodoloji bölümünde takdim edildiği üzere ayrıca Şekil 1 ile belirtildiği gibi klâsik tayin metodları çerçevesi içinde enzim kataliz hızları yönünden incelendiğinde bütün sübstratları ve bu arada asetiltiokolün ile bir sübstrat inhibisyonu gözlenmektedir. Ancak, Şekil 8'de de takdim edildiği gibi bu gözlem aldatıcıdır. Eğer enzim önce tamamen deaktive edilir ve ortamın iyonik şiddeti azaltılırsa allosterik davranış bariz olarak açığa çıkmaktadır. Fakat eğer ortamda fosfat veya Barbital gibi enzimi kısmen aktive eden bileşikler tampon olarak kullanılmışsa Şekil 10 ve Şekil 12'de gözlemlendiği gibi ortamın iyonik kudreti ile kataliz hızı öylesine değişmektedir ki Nachmanson tarafından ilk defa tarif edilen sübstrat inhibisyonu çok düşük sübstrat konsantrasyonlarında dahi gözlenmektedir.

Nitekim Şekil 8a deneyinde gösterildiği gibi ortama 2 mM sitrat ilâve edildiğinde hem allosterik enzimlere has hiperbolik eğri kaybolmakta, hem de sübstrat inhibisyonu gözlenmektedir.

Şekil 8a kontrol deneyindeki hiperbolik eğriye sübstrat içinde mevcut herhangi bir safsızlığın sebep olduğu düşünülemez. Density Gradient ve akrilamid sonuçları da ortamda tek bir protein bulunduğunu teyit ettiğine göre, bu eğri sübstrat aktivasyonuna işaret etmektedir.

Nitekim Şekil 8a

Nitekim, allosterik bir enzimden beklendiği gibi sitrat ile hiperbolik eğri linear hale geçmektedir. 8b deneyinde gösterildiği gibi ise Mytelase ile bilâkis belirlenmektedir. (29) Eğer ortamdaki aktivatörün konsantrasyonu optimum değilse allosterik davranış barizleşmektedir.

Nitekim, optimum 1.58×10^{-3} M sitrat konsantrasyonunun daha düşük ve daha yüksek değerlerinde sübstrat enzimi aktive etmektedir. (Şekil 8c)

Allosterik bir enzimden beklendiği gibi sübstrat analogu bir inhibitör olan mytelase'ın katalize Şekil 9'da gösterildiği gibi ikili bir etkisi vardır. (29)

Çeşitli sübstrat konsantrasyonlarında düşük mytelase konsantrasyonları aynen sübstrat gibi önce modifier merkeze bağlanmakta enzimi dolayısı ile aktive etmektedir. Mytelase konsantrasyonu arttığı zaman ise birleşik bir kompetitif inhibitör olarak enzimi inhibe etmektedir. Mytelase'ın bu ikili etkisi sübstrat konsantrasyonu arttıkça silinmektedir.

Bu da yukarıki izahata tamamen uymaktadır. Çok yüksek sübstrat konsantrasyonlarında mytelase'ın hiçbir inhibitör ve aktivatör tesiri görülmemektedir.

Aktivatörlerin enzime etkisi:Aşağıda takdim edilecek deneylerden de gözlenebileceği gibi enzimin en kuvvetli aktivatörlerinden biri sitrattır. Şekil 10'da sitratin çeşitli konsantrasyonlarının çeşitli sübstrat konsantrasyonlarında kataliz üzerine etkisi özetlenmiştir. Sitratin enzim üzerine etkisi mytelase'ın kine benzemektedir. Ancak teknik olarak çok yüksek sitrat konsantrasyonlarına çıkılamadığından tam inhibitör etki gösterilememiştir. Mytelase'ın kine benzemek üzere sitratin aktivatör ve inhibitör ikili etkisi sübstrat konsantrasyonu arttırıldığı nitbette silinmektedir .(29)

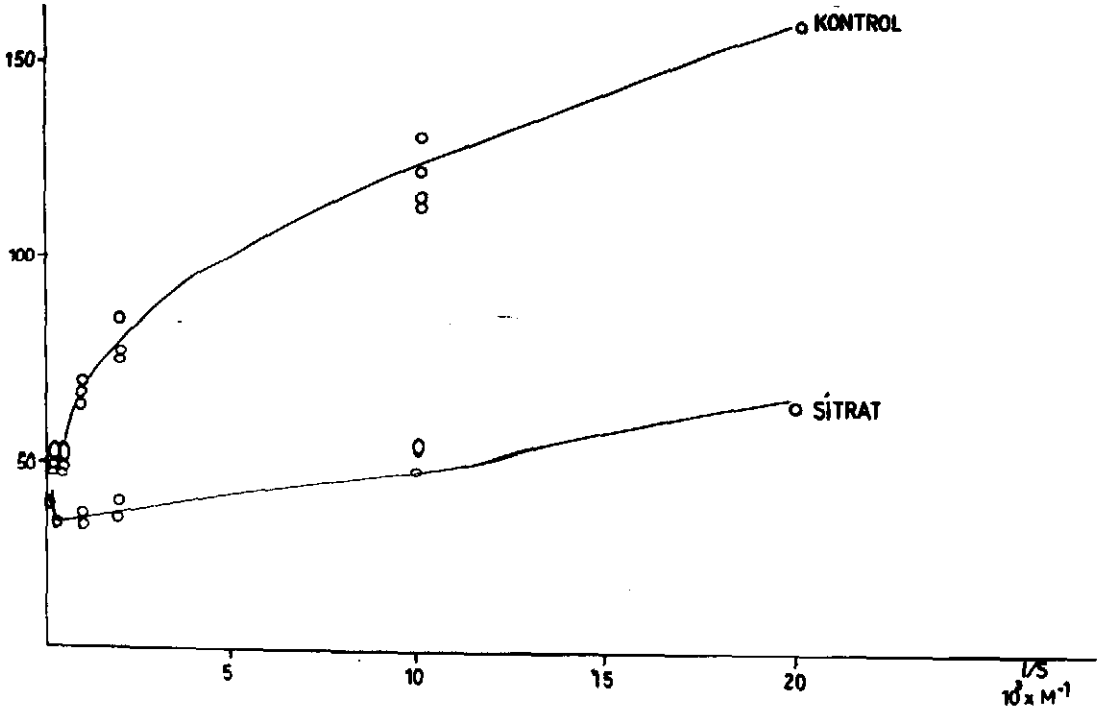
ŞEKİL 8

ENZİM KATALİZİ İLE İLGİLİ LINEWEAVER-BURKE EĞRİLERİ

A) SİTRAT AKTİVASYONU

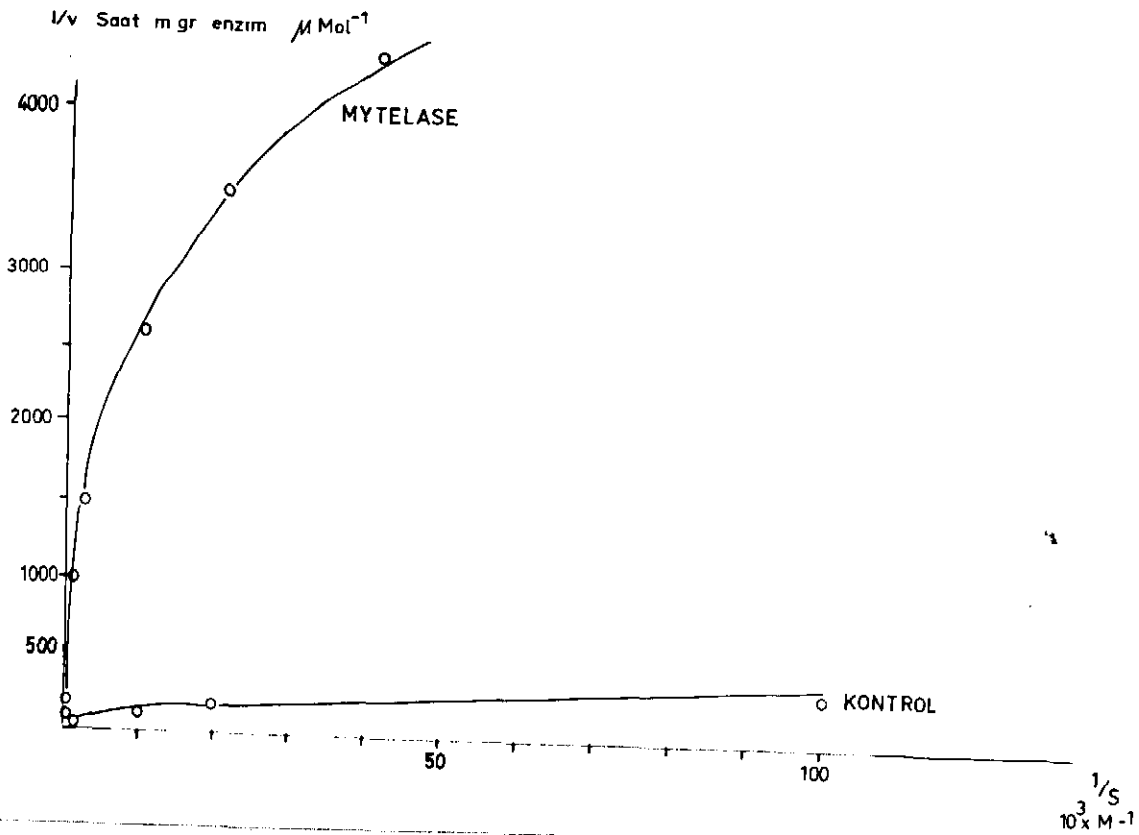
Deney Karışımı: Kontrol deneyinde Sorbat $3 \times 10^{-3}M$, DTNB $5 \times 10^{-5}M$ değişen konsantrasyonlarda ATK, 2-8 mikrogram enzim proteini/ml. pH=6.0, $37^{\circ}C$ 15 dakika hidroliz. İlk hız sübstratın %1'inin bozulmasından önce hesaplanmıştır. Sitrat deneyinde ortama ayrıca $2 \times 10^{-3}M$ sitrat pH=6.0 ilâve edilmiştir. Deney hem "autoanalyzer" hem de spektrofotometrik metotla yapılmıştır. Grafikteki her nokta triple deneyin ortalamasını ifade etmektedir. Teknik Metodoloji Bölümünde bildirildiği gibidir. Kontrol deneyinde 10 mM dan yüksek sübstrat konsantrasyonlarında, sitrat deneyinde 2 mM dan yüksek sübstrat konsantrasyonunda sübstrat inhibisyonu başlamaktadır.

1/v saat mgr enzim M Mol⁻¹



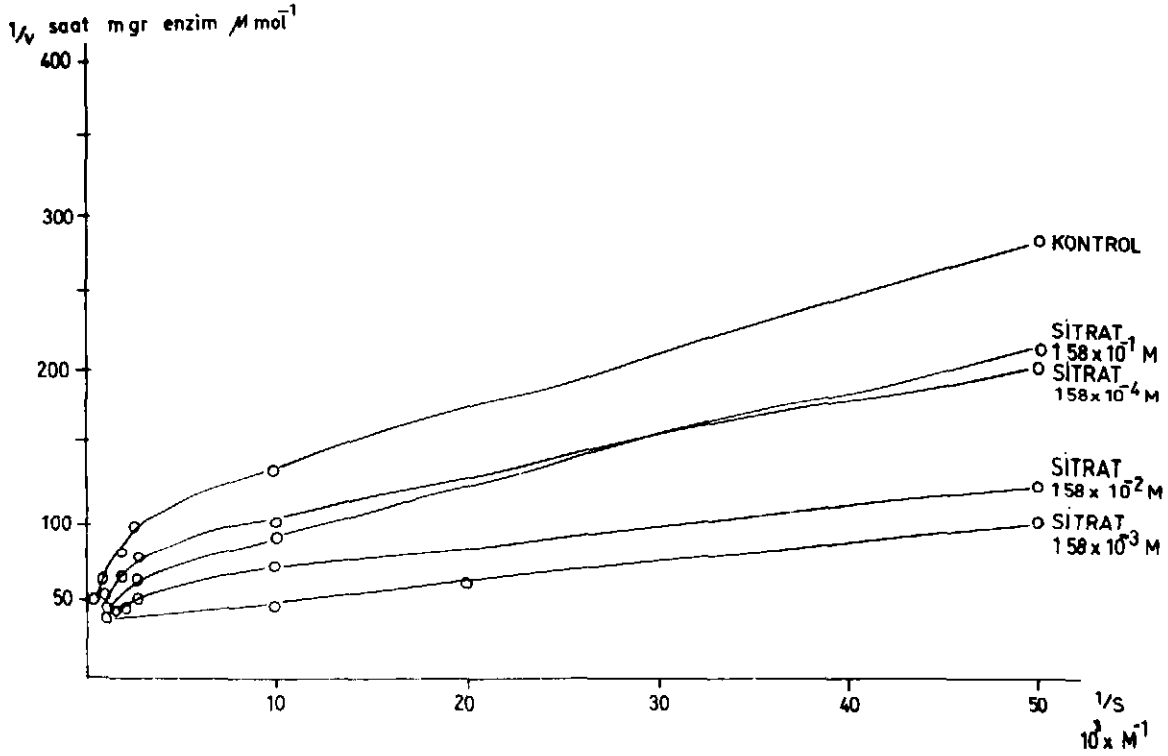
B) MYTELASE İNHİBİSYONU

Kontrol deneyi (A) kısmındaki ile aynıdır. Mytelase deneyinde ortama 5×10^{-7} M Mytelase ayrıca ilâve edilmiştir. Metodoloji (A) kısmında tarif edilenle aynıdır.



C) ÇEŞİTLİ SİTRAT KONSANTRASYONLARINDA LİNEWEAVER-BURKE EĞRİSİ

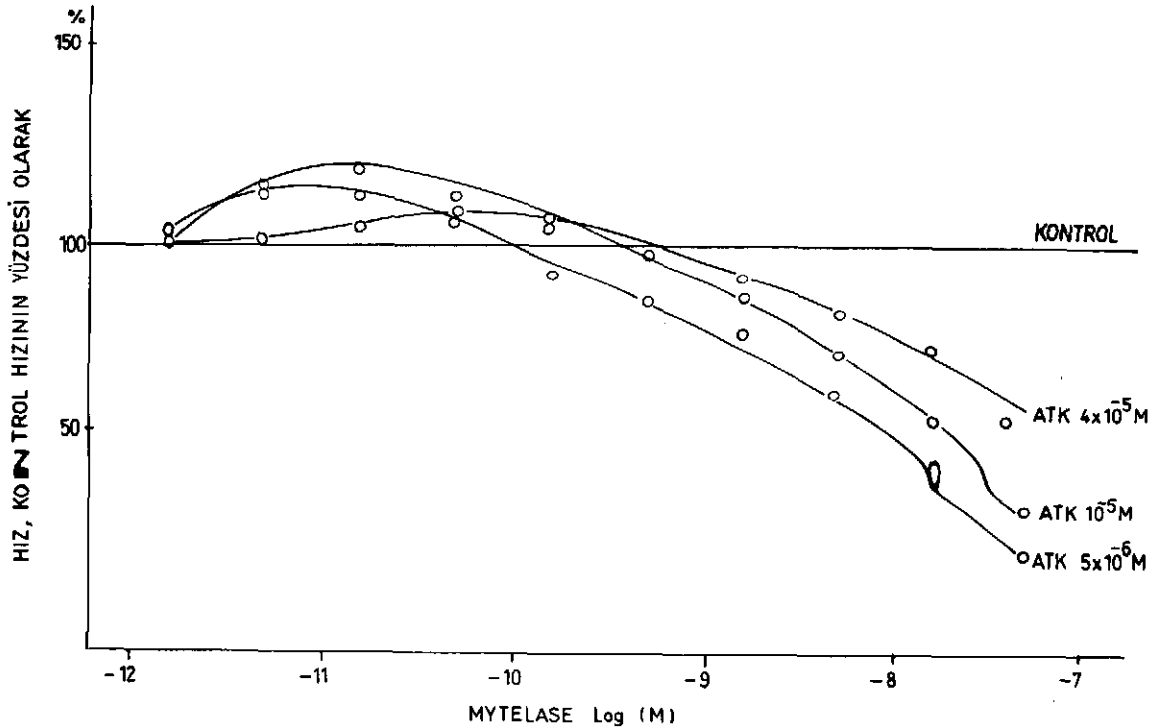
Deney şartları (A) kısmındaki ile aynıdır. Ortama ilâve edilen sitratın konsantrasyonları 1.58×10^{-4} , 1.58×10^{-3} , 1.58×10^{-2} 1.58×10^{-1} M. Metodoloji (A) kısmında tarif edilenle aynıdır.



ŞEKİL 9

MYTELASE'IN İKİLİ ETKİSİ

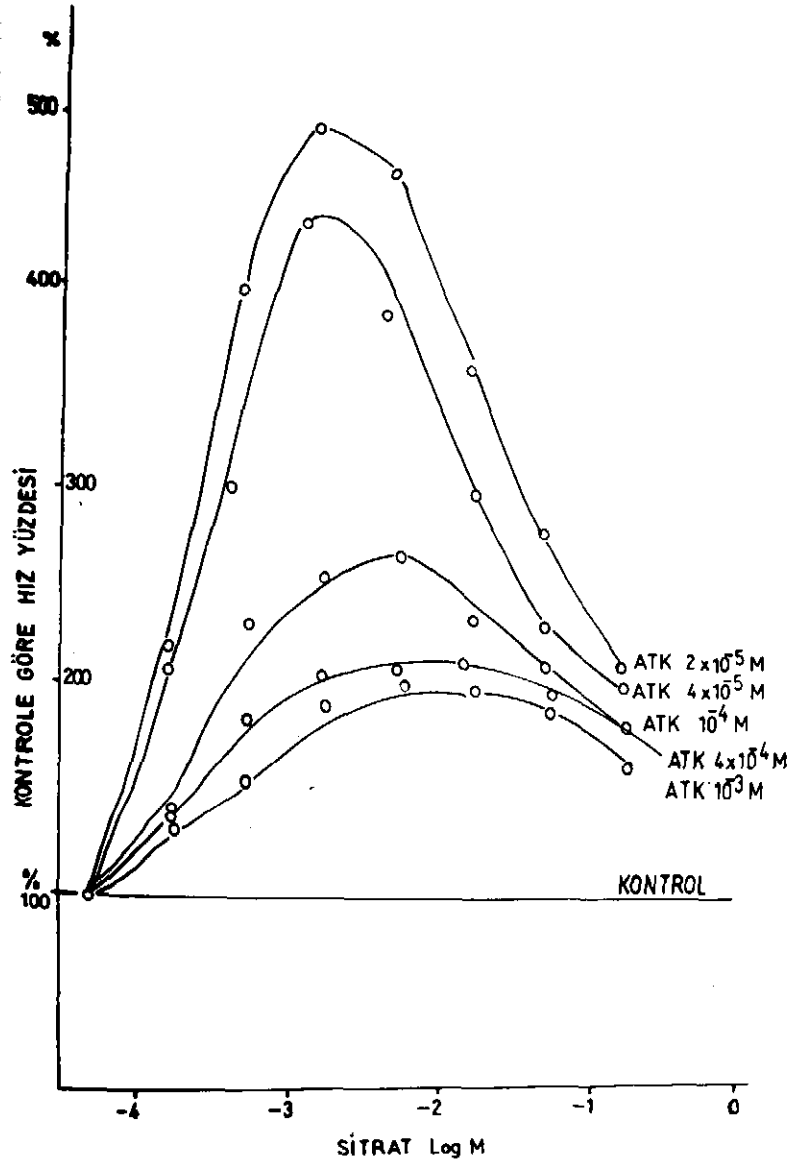
DENEY KARIŞIMI: Sorbat $10^{-3}M$, DTNB $5 \times 10^{-5}M$, sıra ile üç ayrı konsantrasyonda ATK $5 \times 10^{-6}M$, $10^{-5}M$, $4 \times 10^{-5}M$, 10 mikrogram enzim proteini/ml. pH=6.0 15 dakikada $37^{\circ}C$ hidroliz "Autoanalyzer"da ölçüldü. İlk hız, total sübstratın %1'inden azının vukubulduğu süre içinde ölçüldü. Mytelase ilâve edildiği deneylerde, "Modifier" enzim ile önce karıştırılarak 0° da 10 dakika preinkübe edildi, sonra aktivite ölçüldü. Absisde mytelase konsantrasyonunun logaritması, ordinatta mytelase varken bulunan hızın kontrol (sade Sorbat $10^{-3}M$ mevcut) hıza yüzdesi belirtildi. Kontrol deneyi adedi $n = 90$, her mytelase konsantrasyonunda $n = 3$ dü. Deney dizisinde her mytelase'lı aktivite ölçümünden evvel ve sonra triple kontrol aktivitesi tayin edildi, diğer deney şartları ve standard hata Metodoloji Bölümünde bildirildiği gibidir.



ŞEKİL 10

SİTRATIN ENZİMİ AKTİVE EDİCİ ETKİSİ

Deney Karışımı: Kontrol deneyinde Sorbat 10^{-3} M, DTNB 5×10^{-5} M, pH=6.0, ATK beş ayrı deneyde sıra ile 2×10^{-5} M, 4×10^{-5} M, 10^{-4} M, 4×10^{-4} M, 10^{-3} M, pH = 6.0 idi. Sitrat aktivasyonu incelenen deneylerde ortama ayrıca konsantrasyonunun logaritmasının absisinde gösterildiği miktarda sitrat ilâve edildi. Çeşitli sitrat konsantrasyonunda tesbit edilen hızların sorbatlı kontrolde tesbit edilen hıza göre yüzdesi ordinatta gösterildi. Deneyler "Autoanalyzer" ile yapıldı, hidrolizin ilk %1'den ilk hız tespit edildi. Kontrol deneylerinin adedi n = 15, aktivasyon deneylerinde her konsantrasyonda deney adedi n=3 'dü. Standard hata oranı Metodolojide bildirildiği miktarda idi.



Enzimin sitrat tarafından aktive edilebilmesi, bu aktivasyonun ne kadar özgül olduğunun araştırılmasına sebep olmuştur. Eğer çeşitli mono ve dikarboksilik anyonların kataliz hızına etkisi incelenirse, Şekil 11'de görülen bulgular elde edilir. Görüldüğü gibi monokarboksilik asitler optimumu Valerat olan tür ile bir miktar aktivasyon yaratmaktadırlar. Dikarboksilatlardan kısa zincirli olanlar enzimin potent aktivatörü olmakla beraber dört, beş ve altı karbonlu dikarboksilatların etkisi ya hiç yoktur, veya inhibitör mahiyettedir.

Süksinat türevleri incelendiğinde bu türevlerden hiç birinin süksinattan farklı etkide bulunmadığı gösterilmiştir. Ancak, oksalasetat özellikle enzimi fevkalâde yüksek miktarda aktive edebilmektedir. Bu da, oksalasetatın enzimin özgül bir aktivatörü olduğunu ortaya çıkarmaktadır. Şekilde ayrıca trikarboksilatların ve bilhassa özgül aktivatör sitratın etki derecesi gösterilmiştir.

Bu bulgular enzimin katalitik özelliğinin Krebs siklusu intermedierlerinin hiç değilse bazıları tarafından şiddetle etkilenebildiğine işaret etmektedir. Bu yüzden Krebs siklusu ile ilgili bileşiklerin sitrik asit intermedierlerinin ve analoglarının etkisi çeşitli konsantrasyonlarda incelenmiş, sonuç Şekil 12'de gösterilmiştir.

Gözlemlendiği gibi bu birleşiklerin katalize etkisi üç tanesi hariç minimaldir. Oksalasetat en iyi aktivatör olarak tespit edilmiştir. Sitrat, Cis-Aconitat ve sitrat analogu, Trikarbalilat hepsi enzimin aktivatörüdürler.

Enzim aşağıda tartışılacağı gibi SH inhibitörleri tarafından bir miktar etkilenmektedir. Ancak oksalasetat, sitrat, Trikarbalilat ve Cis-Aconitat'ın aktivatör etkisi preparattaki bir metal SH inhibitörünü "Chelat" teşkil ederek uzaklaştırması ile olmamaktadır. Zira, eğer etki mekanizması bu olsaydı, Chelat kapasitesi bakımından bu moleküllerden çok daha güçlü olan EDTA'nın yahut da Tartarat'ın enzimi şiddetle aktive etmesi

gerekirdi ki, şekil 11 ve şekil 12'den gözleendiği gibi bu doğru değildir.

Pirüvat ve Laktat enzimi inhibe etmektedirler. Enzimin ısıya karşı en iyi koruyucusu olan Kolin de katalitik aktiviteyi yüksek konsantrasyonlarda inhibe etmektedir.

Allosterik enzimlerde aktivatörler ne kadar düşük konsantrasyonlarda, ne kadar yüksek aktivasyon verirse o derece özgüdür. (29). Şekil 13'de aktivatör Krebs siklüsünün etkisi bu bakımdan incelenmiştir. Gözleendiği gibi siklusun ilk kademesindeki üç bileşik oksalasetat, sitrat ve cis-aconitat enzimin özgül aktivatörü kabul edilmelidir .

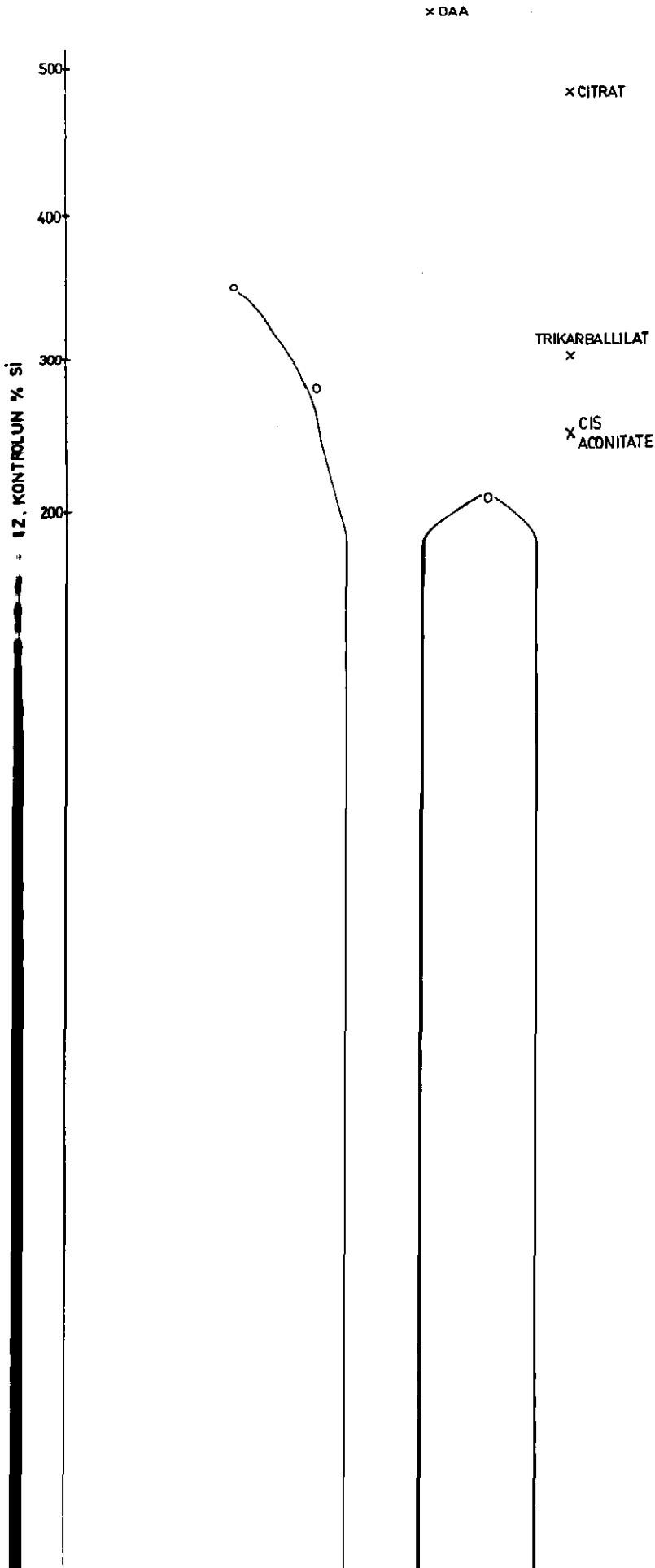
Isının enzim üzerine etkisi deney şartlarına bağlı olarak oldukça karmaşıktır. Denenen şartlarda enzimi diğer allosterik enzimler için doğru olduğu gibi, desansitize etmek imkânı olmamıştır.(29)(30). Şekil 14'de görüldüğü gibi kolin enzimi 40°C'da aynı ile muhafaza etmektedir. Enzimin inert bir bileşik içinde veya aktivatörü ile beraber ısıtılması denatürasyona yol açmaktadır, ve enzim hızı deaktive ve aktive şekilde aynı miktarda , her deneyde birbirine paralel olarak kaybolmaktadır.

İlginç olarak civa biklorür ilâvesi ile enzim diğer şartlardan farklı olarak tamamen deaktive olmakta, sübstrat tarafından aktive edilememekte , fakat ortama yeniden sitrat ilâve edildiğinde muhtemelen Chelat teşkil ederek civa tutulduğu mahalden uzaklaşmakta ve enzim yeniden katalitik faaliyetini gösterebilmektedir. Civanın enzim denatürasyonuna etkisi yoktur. Çünkü sitrat ile denendiğinde enzim denatürasyon hızı diğer şartlardaki hıza paraleldir.

ŞEKİL 11

ÇEŞİTLİ KARBOKSİLİK ASİTLERİN ETKİSİNİN
MOLEKÜL BÜYÜKLÜĞÜ İLE BAĞINTISI

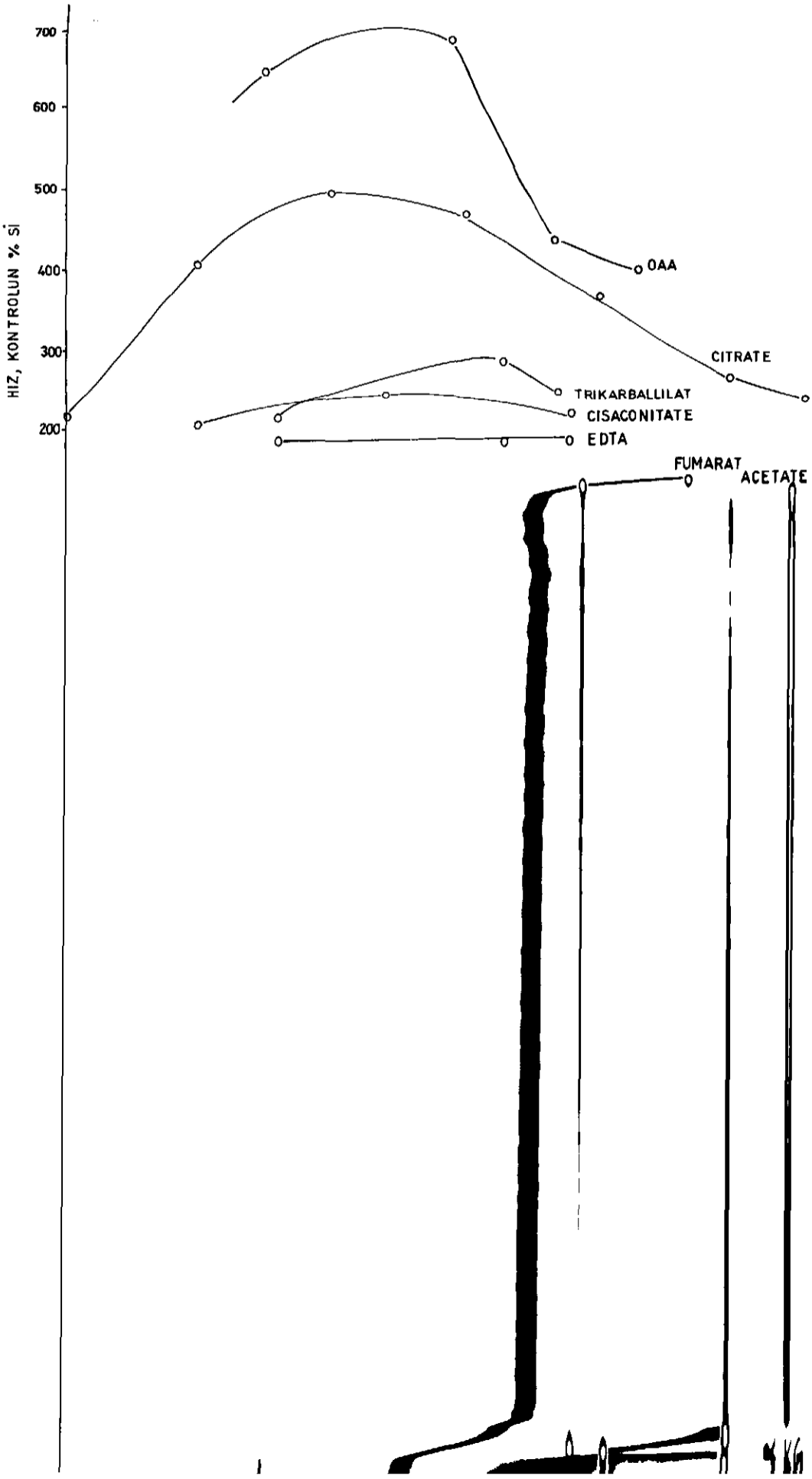
Deney karışımı: Sorbat $2 \times 10^{-3}M$, ATK $4 \times 10^{-5}M$, DTNB $5 \times 10^{-5}M$, pH=6.0, $37^{\circ}C$. "Modifier" ilâve edilen deneylerde konsantrasyon $7 \times 10^{-3}M$ dir. Azami hidroliz hızı %1 olmak üzere hidrolize ait ilk hız tespit edilmiştir. Ordinatta kontrol deneyine (sade Sorbat $2 \times 10^{-3}M$) göre tespit edilen hızın yüzdesi gösterilmiştir. Absisde kullanılan "Modifier"ın karbon atomunun adedi belirtilmiştir. Monokarboksilik ve dikarboksilik asitlere ait değerler grafiklenmiştir (o-----o); bu asitlerin türevlerine ait değerler ait oldukları sırada ayrıca belirtilmiştir (x). Trikarboksilik asitlere ait değerler de gene ayrıca belirtilmiştir (x). Deney "Autoanalyzer" ile yapılmıştır. Kontrol deneyi adedi $n = 60$, her birleşik için $n=3$ dür. Deneylere ait standard hata Metodoloji Bölümünde verilen kıymettir.



ŞEKİL 12

KREBS SIKLÜSÜ İNTERMEDYERLERİNİN,
ÇEŞİTLİ ANALOGLARININ VE KOLİNİN ETKİSİ

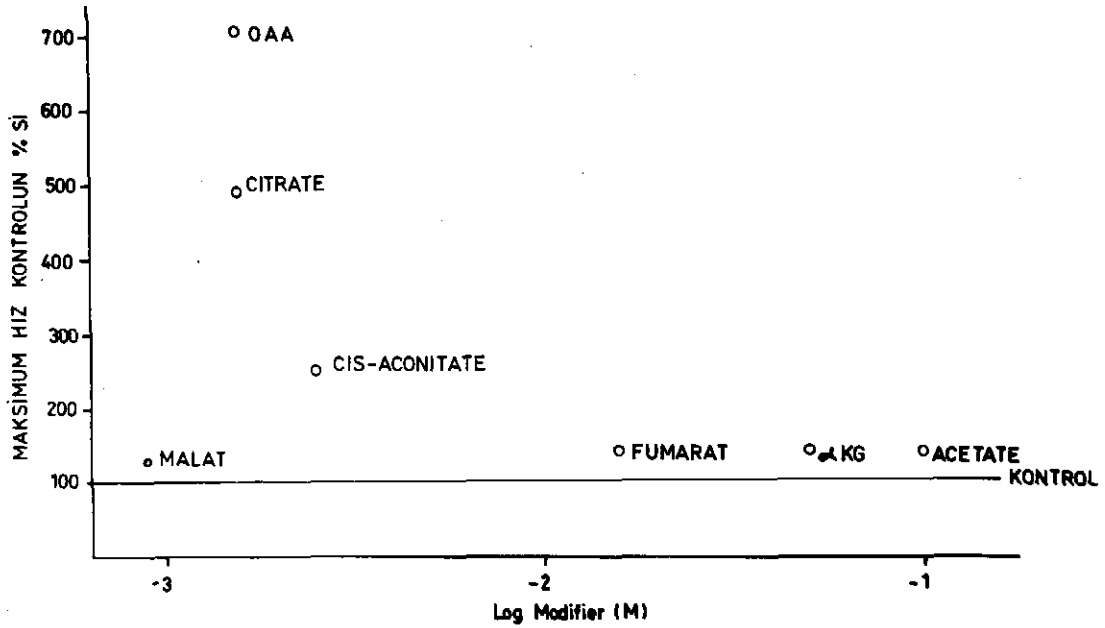
Deney karışımı: Sorbat $2 \times 10^{-3} M$, ATK $4 \times 10^{-5} M$, DTNB $5 \times 10^{-5} M$, pH=6.0, $37^{\circ}C$. "Modifier" ilâve edilen deneylerde konsantrasyon logaritması absizde gösterilmiştir. Azami sübstrat hidrolizi %1 olmak şartı ile hidrolize ait ilk hız tespit edilmiştir. Ordinatta "modifier" mevcut iken tespit edilen hızın Kontrol deneyine göre (sade Sorbat $2 \times 10^{-3} M$) yüzdesi belirtilmiştir. Deney "Autoanalyzer" ile yapılmıştır. Kontrol deneyi adedi n=39, her "modifier" konsantrasyonu için n=3'dür. Deneylere ait tesbit edilen standart hata Metodoloji Bölümünde verilen değerdedir.



ŞEKİL 13

KREBS SIKLUSU İNTERMEDYERLERİNDEN
AKTİVATÖR OLANLARININ MAKSİMUM ETKİLERİ

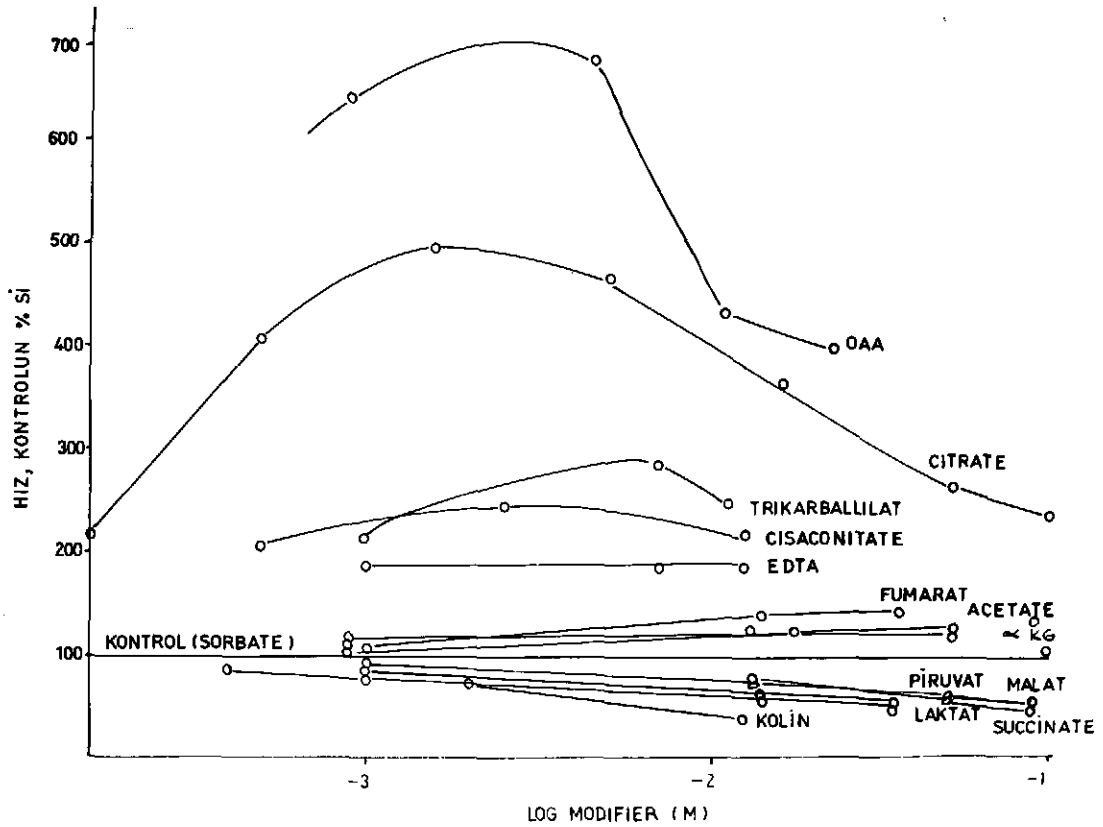
AKTİVATÖR intermedyerlerin maksimum etkisi yüzde olarak ordinatta, bu etkiye yol açan intermedyer konsantrasyonunun logaritması absiste gösterilmiştir. Deney şartları ŞEKİL 12 ile aynıdır.



ŞEKİL 12

KREBS SIKLUSU İNTERMEDYERLERİNİN,
ÇEŞİTLİ ANALOGLARININ VE KOLİNİN ETKİSİ

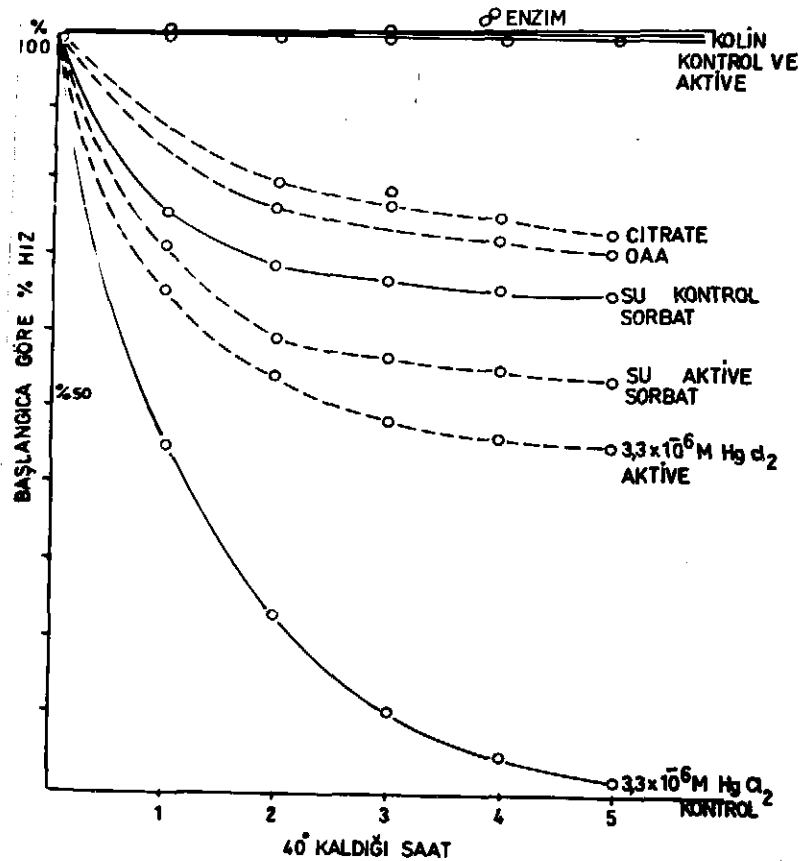
Deney karışımı: Sorbat $2 \times 10^{-3} M$, ATK $4 \times 10^{-5} M$, DTNB $5 \times 10^{-5} M$, pH=6.0, $37^{\circ}C$. "Modifier" ilâve edilen deneylerde konsantrasyon logaritması absizde gösterilmiştir. Azami sübstrat hidrolizi %1 olmak şartı ile hidrolize ait ilk hız tespit edilmiştir. Ordinatta "modifier" mevcut iken tespit edilen hızın Kontrol deneyine göre (sade Sorbat $2 \times 10^{-3} M$) yüzdesi belirtilmiştir. Deney "Autoanalyzer" ile yapılmıştır. Kontrol deneyi adedi n=39, her "modifier" konsantrasyonu için n=3'dür. Deneylere ait tesbit edilen standart hata Metodoloji Bölümünde verilen değerdedir.



Şekil 14

ISININ ENZİM ÜZERİNE ETKİSİ

Hazırlanan enzim ya iyonsuz ortamda (SU), ya $2 \times 10^{-3} M$ pH=6.0 Sorbat tamponu içinde (SORBAT) ya $2 \times 10^{-3} M$ pH=6 Citrate (SİTRAT) ya $2 \times 10^{-3} M$ Sorbat, $10^{-3} M$ oksalasetat pH=6.0 (OAA) ya $2 \times 10^{-3} M$ Sorbat $3,3 \times 10^{-5} M$ $HgCl_2$ pH=6.0 ($HgCl_2$) veya $2 \times 10^{-3} M$ SORBAT $10^{-2} M$ Kolin (KOLİN) pH=6.0 içinde 33 mikrogram enzim proteini ml. de olmak üzere sulandırıldı ve $40^\circ C$ çeşitli süre inkübe edildi. Başlangıçta ve birer saat ara ile alınan nünuneler ya pH=6.0 $0^\circ C$ sorbat KONTROL 0—0) yahut pH=6.0 $0^\circ C$ Citrate (AKTİVE 0—0) içinde sulandırıldı ve "Autoanalyzer" ile analiz edildi. OAA ve Citrate deneylerinde sadece aktive hızlar incelenmiştir. KONTROL deneyinde deney karışımı $2 \times 10^{-3} M$ Sorbat, $4 \times 10^{-5} M$ ATK, $5 \times 10^{-5} M$ DTNB 3.3 mikrogram enzim proteini/ml. pH=6.0 yapısında idi; AKTİVE deneyde Sorbat yerine $2 \times 10^{-3} M$ pH=6.0 sitrat ilâve edilmişti. İnkübasyon ısı $37^\circ C$, süresi 15 dakika idi. Absisde enzimin $40^\circ C$ tutulduğu süre Ordinatta bu süre sonunda tesbit edilen hızın başlangıçtaki hıza yüzde oranı ifade edilmiştir. Deney tertibi, ve standard hata Metodoloji Bölümünde bildirildiği üzere tesbit edilmiştir.



TARTIŞMA

Yukarda takdim edildiği gibi memeli beyninden asetil-kolinesteraz spesifik aktivite bakımından yüksek bir kat olmasa dahi, akrilamid ve density Gradient santrifüjünde tek bant verecek seviyede saflaştırılmıştır. Nitekim, bu saf enzim muhtelif Sephadex'lerde tek zirve halinde elüe edilmektedir.

Enzimin süstitüe selülozlara aktif merkezi ile yapışması kromatografisine el vermemiştir. Teklif edilen bütün biokimyasal saflaştırma metodları ile enzim daha fazla saflaştırılamamıştır.

Enzimin nisbeten küçük molekül ağırlığı literatürde bundan önce bildirilen en ufak değer olan ikiyüzaltmışbinden çok uzak bir rakamdır.(34) Evvelce takdim edilen bulgular ve bilhassa 8 M üre ile molekül ağırlığının ufaltılamaması enzimin en ufak aktif ünitesi halinde saflaştırıldığı intibasını yaratmaktadır.

Evvelce bildirilen yüksek molekül ağırlıklarının birkaç sebebi olabilir. Enzim kesif olarak tutulduğunda bir saat içinde aglomerize olmakta ve akril amid'de Orijin'e doğru kaymaktadır. Diğer bir izah da albümin deneyi ile gösterildiği gibi yabancı bir protein varken enzimin bu proteine yapışarak ağır bir kompleks meydana getirmesi olabilir. Nitekim, bu tip bir preparat ile çalışmak Şekil 4'de gösterildiği gibi enzimin kinetik karakterinin fevkalâde farklı olması dolayısı ile doğru sonuç vermez.

Saflaştırılmış enzim allosterik bir proteinden beklenen özellikleri göstermektedir.(29)(30)(31)(32). Sübstrat aktivasyonu aktivatör ile eğrinin klâsik Michaelis Menten eğrisine dönüşü, inhibitör ile hiperbolik karakterin barizleşmesi,

sübstrat analogu bir inhibitörünikili etkisi , aktivatörlerin (oksalasetat, sitrat gibi) ikili etkisi , bazı birleşiklerin (piruvat, laktat) sadece inhibe etmesi bu özelliklerden bazılarıdır.

Yapılan çalışmalarda enzim desansitize edilememiştir. Ayrıca kolayca aglomerasyona uğraması monomer polimer dönüşmesini incelemeye mani olmuştur. Bununla beraber, bütün bulgular kuvvetle enzimin allosterik olduğuna işaret etmektedir.

İlk defa Nachmanson tarafından tarif edilen (5) sübstrat inhibisyonu ancak bazı şartlarda gözlenmektedir. Eğer enzim önceden tamamen aktive edilirse (yüksek konsantrasyonda fosfat veya barbital gibi) sübstratının ve diğer iyonların etkisi deney şartlarına göre farklı olmakta, sübstrat aktivasyonunun gösterildiği bu enzim(Şekil 8) Şekil 1'de de belirtildiği gibi bilâkis sübstrat inhibisyonu karakteri arz etmektedir. Bu sebeple enzim hakkında evvelce teklif edilen kataliz modelleri bu nokta göz önünde tutulmadığı için yanlıştır. Evvelce tarif edilmiş klâsik deneylerde pH=8.0 gibi solüsyon içinde bikarbonatın kolayca birikebileceği ortam kullanılmıştır. Oysa, bikarbonat anyonu enzimi kuvvetle aktive etmektedir. Bundan dolayı klâsik şartlarda mantikî bir kataliz modeli kurmak imkânsızdır.

Bu çalışmada enzim hakkında ilk defa evvelce hiç bildirilmemiş fakat fizyolojik değeri çok yüksek bir unsur ortaya çıkarılmıştır. Bu da, Krebs Siklüsünün ilk üç bileşiğinin (oksalasetat, sitrat ve cis-aconitat) enzim üzerindeki kuvvetli aktivatör etkisidir.

Literatürde daha önce bildirildiği gibi oksalasetat , sitrat ve isositrat allosterik metabolik yol tanzim edici asetil Co A karboksilaz(35), pirüvik karboksilaz (36) ve fosfofruktokinaz (37)(38) için önemli "Modifier"lardır.

Mitokondrilerin satüre olarak çalışması sonunda bu bileşiklerin oksidatif fosforilasyonunun doygunluğunu işaret etmek üzere sitoplazmaya sızmaları asetil Co A karboksilaz aktivasyonu ile yağ sentezini, pirüvik karboksilaz aktivasyonu ve fosfofruktokinaz inhibisyonu ile gluconeogenesis'i hızlandırmaktadır. Bu iş için gerekli konsantrasyon 1-5 mM arasındadır. Sonuçlarda gösterildiği gibi bu bileşiklerin asetilkolinesterazlara etkileyen konsantrasyonları da 1-5 mM arasındadır.

Bu bulgu, enzimin iletimdeki rolü hakkında önemli bir pencere açmaktadır. Şöyle ki: İletimin bilfiil cereyan ettiği mahallerde (synaps, motor nihaî plâk, Ranvier nodülü) enzim ile beraber daima bol miktarda mitokondri bulunmaktadır.(8)(5) Gene aynı mahallerde iletim esnasında metabolik faaliyetin fevkalâde arttığı, oksijen kullanılmasının çoğaldığı gösterilmiştir. (8)(5).

Bu olaylar esnasında mitokondrinin oksidatif fosforilasyon kapasitesinin doyması beklenir. Dolayısı ile oksal asetat ve sitratın stoplazmaya sızması civarda bulunan membransal asetilkolinesterazı aktive etmekte ve aralıktaki asetilkolinin buna bağlı olarak tamamen hidrolizi muhtemeldir.

Bu takdirde iletim sona erecektir. Gene gösterildiği gibi aynı mahallerde enzim daima bir miktar aktıvdır. Zira spontan olarak asetilkolin vesiküllerinin patlaması ile iletim çağlağına serbest hale geçen asetilkolin parçalamakta ve tam bir uyarım husule gelmektedir. Ancak, yukardan gelen iyonlarla bol miktarda serbest hale geçirilen asetilkolini hidroliz etmek için her halde aktive edilmiş bir enzim gerekmektedir. Bu iş için de işaret doymuş mitokondri olabilir.

Asetilkolinesterazın aynı zamanda asetilkolin uyarım reseptörü olup olmadığı hakkındaki tartışmalı nokta da (15) bu açıdan bakılırsa kolayca izah edilebilir. Zarda deaktive ve kinetik karakteri tamamen farklı iki ayrı enzimin iletimi tanzim etmesi , yani deaktive enzimin asetilkolin reseptörü vazifesi görmesi yukarda bildirilen bulgular karşısında tamamen muhtemeldir.

REFERANSLAR

- 1) Loach, Sekura, Hodsell Stemer. Biochemistry Vol 9 No:4
Feb 17 1970 p 724
- 2) Green D.E. ve J.F. Perdue Proc Nat Acad Sci 55:1995: 1966
- 3) Racker E Mechanisms in Bioenergetics (New York Academic Press
1965) Sayfa 259
- 4) Nachmansohn D Chemical and Molecular Aspects of Bioelectro-
genesis, A.P., eds. Elsevier Amsterdam and New York 1961
Sayfa 237-261
- 5) Nachmansohn D Academic Press New York 1959 Sayfa 235
- 6) Bennett R.J. J Cell Biol 12: 247: 1962
- 7) Torack R.M. ve R Bennett Exptl. Neurol. 6: 224: 1962
- 8) Zacks the Motor Endplate (Sounders) Philadelphia London
1964
- 9) Boyd I .A. Martin A.R. J. Physiol. London 132:61: 1956
- 10) Schlaepfer W.W. R.M. Torack J.Histochem. Cytochem. 14:369:
1966
- 11) del Castello ve Katz B. J.Physiol. London 128: 396:1955
- 12) Brooks ve Curtis D.R. J.Physiol. 135:655:1957

- 13) Nachmanson D. ve I.B. Wilson Advan. Enzymol. 12:259:1951
- 14) Nachmanson D. Proc.Nat. Acad. Sci. 61:1036: 1968
Schoffeniels E. Biochim. Biophys. Acta. 26:585:1957
- 15) D.A. Zupancic Ann. N.Y. Acad.Sci. 144 : 689:Oct 67
- 16) P.Ö. ve Ferhan Tezcan Doktora Tezi
- 17) G.Ciliv Doçentlik tezi
- 18) R.L.Jackson M.H.Aprison J.Neuro. Chem. 13:1351: 1966
- 19) Dr.Maynert Brain Research Organisation Seventh Regional Seminar 2 Dec 1968
- 20) G.L. Ellman Biochemical Pharmacology (Acad Press) Vol:7 Sayfa 88-95
- 21) Meites L.Meites T. Anal.Chem. 20:984:1948
- 22) Davis ve Ornstein Ann.N.Y.Acad. Sci. 121:404:1965
- 23) Schachmann Biochemistry 2:887:1963
- 24) O.M. Lowry N.J.Rosebrough J.Biol.Chem. 193:265:1951
- 25) Hsier Inouye Inborn Errors of Metabolism Part:2 Medical Publishers Sayfa 164
- 26) O.Warburg W.Christian Biochem. 2: 710:384:1941

- 27) Colowick ve Kaplan Methods in Enzymology A.P. Vol I
- 28) S.Hestrin J.Biol. Chem. 180:249:1949
- 29) Monod Wyman Changeux J.Mol. Biol. 12:88:1965
- 30) Monod Changeux Jacob J.Mol.Biol. 6:306:1963
- 31) Frieden J.Biol. Chem. 239:3522:1964
- 32) P.T.Özand Hacettepe Press Ankara
- 33) Lineweaver H and Burk D. J.Am.Chem.Soc. 56:658:1939
- 34) W.Leuzinger M.Goldberg J.Molec. Biol. 40:217:1969
- 35) Wakil S.J.Lipid Metabolism Ann.Rev. Biochem. 31:369:1962
- 36) Serutton M.C., D.B.Keech J.Biol. Chem. 240:574:1965
- 37) Permegiani A.R.M.Bowman Biochem. Biophys. Res.Com. 12:269:
1963
- 38) Garland P.B. P.J.Randle Nature 200:169:1963
- 39).T.E.Weichselbaum, Am.J.Clin.Pathol.Suppl.10:40:1946