

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
BİO KİMYA ARAŞTIRMA BÖLÜMÜ

**İNSAN SERUM PSEUDOKHOLINESTERASE'İNİN  
KRİSTALİZASYONU VE PURİFİKASYONU  
İÇİN YENİ BİR METOD**

**Kimya Yüksek Mühendisi  
NURTEN RENDA**

Doktora Tezi  
1 9 6 9

**ÖZET:**

1) Normal insan serum pseudocholinesterase'ının kristallizasyonu ve saflaştırılması için uygulanan yeni bir metod ile yüksek verimli ve tatminkâr bir pürifikasyon metodu bulunmuştur.

2) Evvelce enzimin saflaştırma ameliyesi için pH, etanol tuz ve protein konsantrasyonları kontrol edilmek şartı ile plazmadan saflaştırılma yoluna gidilirken, yeni metod ile enzim dışındaki proteinler ısı denatürasyonu ile bertaraf edilerek, moleküler eleme (Sefadex G-200) nonspesifik adsorbsiyon (bentonit) ve DEAE (Diethylaminoethyl) ve ECTEOLA (epichlorohydrin trietanolamin) süstitüe sellülozlar üzerinde spesifik kromatografi ile enzimin saflaştırılması temin edilmiştir.

3) Spesifik kromatografide enzimin allosterik özelliğinden faydalanılmıştır.

**GİRİŞ:**

S.Edman<sup>(1)</sup> tarafından at serum pseudocholinesterase'ı için bir purifikasyon metodu tarif edilmiştir.

Daha sonra Surgenor ve Ellis alkol fraksiyonuna dayanan bir metod geliştirerek daha saf preparasyonlar elde etmişlerdir.<sup>(2,3)</sup>

Çalışmada PH, ionik kuvvet, ethanol konsantrasyonu ve temperatur, kontrol edilmek suretiyle plasma cholinesterase'ı plazma proteinleri bakımından 3400 kere konsantre edilebilmiştir.

Ultra santrifüjle yapılan çalışmalarla da, çok saf olmasada, plazmadan 11.000 kere daha aktif enzim elde edilmiştir. Bu değer enzim konsantrasyonu olarak %0,01 den daha fazla plazma proteini ihtiva etmemektedir.

İnsan plazmasından cholinesterase, mukoprotein ve metal bağlayan proteinlerin ayrılması için bazı teknikler geliştirilerek, saf fraksiyonlar elde edilmiş, fakat fizyolojik önemi açıklanmamıştır.

Meselâ, fraksiyon I-fibrinojen ve antihemofilik globulin ihtiva eder. Fraksiyon II- çeşitli antikorları , fraksiyon III ise aglutinin, protrombin ve plasminojen ihtiva eder.

Malmström ve arkadaşları, çeşitli kromatografik metodlarla, pseudocholinesterase'ı daha ileri saflaştırmışlardır. Fakat verim yüksek olmamıştır.

Buraya kadar ~~te~~kdım edilen bulgulardan anlaşılabilceği gibi elde tatminkâr ve etraflı çalışmaya imkân verecek bir saflaştırma metodu yoktur.

Beri yandan plazma pseudocholinesterase'ının çeşitli varyantları tarif edilmiştir. (5,6). Gene LaDu ve arkadaşları pseudocholinesterase'ın fosfat tarafından aktive edildiğini göstermişler, fakat bu aktivasyonun mahiyetini araştırmamışlardır. İnsanlardaki pseudocholinesterase varyantlarının ilk önce Lehman tarafından dibucaine ile farklı oranda inhibe olduğu tesbit edilmiştir. Ancak bu inhibisyonun da

mahiyeti etraflıca araştırılmamıştır<sup>(6)</sup>. Harris ve arkadaşları diğer bir birleşikle bu sefer bir anyonla, flüorle bazı enzim varyantlarının farklı inhibe olduğunu rapor etmişlerdir<sup>(7)</sup>. Ancak bu olayın da moleküler esası etraflıca incelenmemiştir. Son olarak, bölümümüzde yapılan çalışmalar enzimin allosterik bir protein olduğunu ortaya koymuştur<sup>(8)</sup>. Allosterik etken birleşikler iki grup altında toplanabilmiştir:

- 1) Kuarterner azot ihtiva eden birleşikler (Kolin ve türevleri)
- 2) Anyonik karakter arzeden birleşikleri (Sitrat ve Krebs siklüsü türevleri)

Bütün bu bulguların iyi bir şekilde moleküler seviyede izah edilebilmesi için enzimin geniş ölçüde çok saf olarak elde edilmesi gerekmektedir. Mevcut metodlar elverişli olmadığından burada tarif edilen yeni metodun geliştirilmesi yoluna gidilmiş ve enzim kristalize edilebilmiştir.

Metod öngörüldüğü şekilde 10.000 defaya yakın bir saflaştırma temin etmiş, yüksek randıman vermiştir. Tatbiki çok kolay olan bu metodla enzim gerek insan plazmasından, gerekse de Fraksiyon IV'den başlanarak saflaştırılabilir.

**MATERYAL ve METOD:****Materyal:**

Enzim kaynağı olarak taze veya tedavi maksadıyla kullanılmaya yeteneğini kaybetmiş insan plazması veya fraksiyon IV kullanılabilir. (9,10)

Plazmanın klâsik kan bankası metodları ile fraksiyonlanması esnasında cholinesterase fraksiyon IV ile beraber ayrılır; metal bağlayan proteinler de bu fraksiyonda yer alır. Fraksiyon IV'ün sub fraksiyonu ile enzim konsantre edilir. Bu kısım  $\alpha_2$ -globülinlerce zengindir ve biraz da labil karbohidrat ihtiva eden protein mevcuttur.

Çalışma yapılincaya kadar kan bankasından alınan insan plazması dondurulur.

Plazmanın eritrosit acetylcholinesterase'ı ile kontaminasyonu veya hemoliz önemli değildir. Çünkü, pürifikasyonun ilk kademelerinde, eritrosit enzimi tamamen bertaraf edilir.

Kullanılan her plazmanın normal enzim ihtiva edip etmediği araştırılır ve sadece enzim ihtiva edenler birleştirilerek toplanır<sup>(11)</sup>.

Eğer başlangıç maddesi olarak fraksiyon IV kullanılırsa, kan bankasından donmuş yaş çökelek alınır, hemen amonyum sülfat ile çöktürülür ve devamlı santrifüj ile (continuous flow centrifugation) aktif fraksiyon toplanır. Bunun için fraksiyon IV, önce %10 luk olacak şekilde suda çözülür. Bundan sonraki kademeler plazma gibi muamele edilir.

Her iki kaynak da memnuniyet vericidir. Fakat, ikincisinde yani Fraksiyon IV'den bol miktarda materyal kısa zamanda saf olarak izole edilebilir.

Kullanılan bütün kimyasal maddeler C.P. derecesindedir. DEAE, ECTEOLA ile Sephadex G-200 bilinen metodlara göre hazırlanır<sup>(12)</sup>. Hız tayinleri Zeiss FMQII spektrofotometresinde yapılır.



Enzim Tayini:

Enzim aktivitesinin tayini metodu daha önce neşre-  
dilmiştir<sup>(8,13)</sup>. Enzim aktivitesini yarı kantitatif bir  
tarzda tayin eden özel bir "Screening test -tarama testi"  
de neşredilmiştir<sup>(12)</sup>. Bu sonuncu test yapılması ve tatbiki  
kolay olması çabuk sonuç vermesi bakımından genellikle  
kolon kromatografisi esnasında elüsyonu takip için kulla-  
nılmıştır.

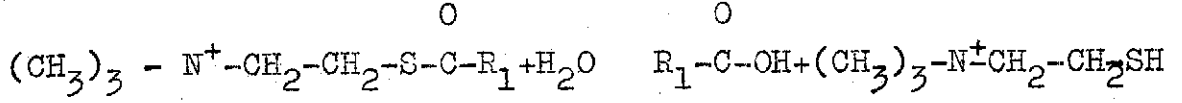
Enzim aktivitesinin tayini için kullanılan karışı-  
mın yapısı:  $10^{-1}$ M potasyum fosfat,  $6.7 \times 10^{-5}$ M DTNB (5,5'  
dithio bis (2-nitro) benzoic acid) değişik molaritede (ge-  
nellikle  $10^{-3}$ M) tiyoester pH:8 ve ilk hız ölçümüne elve-  
rişli miktarda enzim. Bu çalışma esnasında genellikle  
bütiriltiyokolin kullanılmıştır. Genellikle literatürde  
asetil kolin veya asetiltiyokolin kullanılışı tavsiye edi-  
lirse de, eritrosit asetilkolinesterazı asetiltiyokolini  
hidroliz edebilirken, bütiriltiyokoline etkilemez.

Eğer deneyde bütiril tiyokolin kullanılırsa en fazla hemolizli bir serumda dahi plazma pseudocholinesterase'ının miktarı doğru olarak ölçülebilir.

Butyrylthiocholine nonenzimatik olarak pH:8 de hidroliz olur. Bu spontan hidrolizin sonucu bozmaması için, spektrofotometre enzim hariç reaksiyon karışımının bütün komponentlerini ihtiva eden bir KÖR küveti ile "0" absorban- sa ayarlanmıştır. Enzim üniteleri hidrolizin ilk %1-2 kısmının cereyan ettiği zaman zarfında yani ilk hızdan hesap edilir. Bu çalışmada bir ünite, pH:8 de, oda hararetinde, 1 saatte 1 mMol tiyoester hidroliz eden enzim olarak ifade edilmiştir.

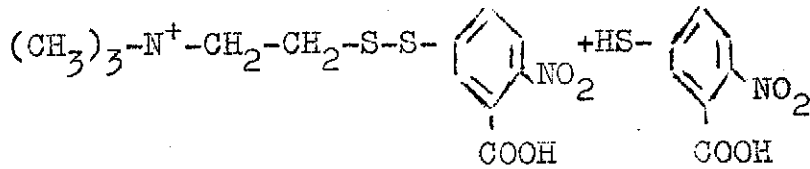
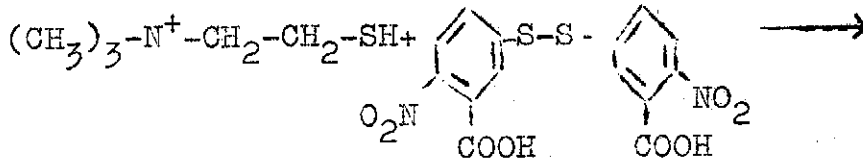
"Screening test" de ise, 1 cc. karışımında, 1 cm. ışık yolunda 0,625 optik dansite verecek kadar (0,05 mMol redükte DTNBH) hidrolizin kaç dakikada cereyan ettiği tesbit edilir.

Tepkimenin kimyası:



R<sub>1</sub>: bütirat, asetat.

Bu açığa çıkan thiol, 5,5' dithiobis 2-nitro benzoat (DTNB) ile reaksiyona girer. Bu maddenin okside şeklinin absorpsiyonu ultraviyolede verirken açığa çıkan redükte şekli 412 nm da görünür maksimum verir.



## PURİFİKASYON METODU:

Bütün deneyler ayrıca belirtilmediği takdirde 0-3°C arasında çalışılmıştır. Kademeler en az 10 kere tekrarlanmıştır.

I. Kademe:

Bu kademede, plazmada pseudocholinesterase ihtiva etmeyen proteinler çöktülecektir.

Muayyen hacimde plazmaya 57,5% saturasyona erişene kadar solid amonyum sülfat yavaş yavaş ilâve edilir.

(370 gr/l)

Fraksiyon IV kullanıldığı zaman enzim aktivitesini kaybetmemek için bazen 55% saturasyon kâfi gelmektedir. Bu ufak bir nümunedeki yapılacak bir ön deneme ile tayin edilir. Santrifügasyonla toplanan çökelti atılır. (12000 g/30 dk) 70% saturasyona erişinceye kadar, berrak süpernatana ammonium sülfate yavaş yavaş ilâve edilir. (86 gr/l L).

Berrak süpernatant biriktirilir ve santrifügasyondan sonra atılır (12000 g/30 dk). Toplanan çökelti minimal  $5 \times 10^{-4}$  M EDTA pH 8 ile çözülür. Elde edilen solüsyon hafif bulanıktır. 200 ml yi geçmez. Bir aydan fazla donmuş olarak saklanabilir.

## II. Kademe:

Enzim solüsyonu bir şişeye konur, ara sıra çalkalıyarak  $55^{\circ}\text{C}$  ye ayarlı bir su banyosunda iki saat bırakılır. Solüsyon çok bulanık ve koyudur. Santrifüjle az miktardaki çökelti atılır.

Aktif çözelti hacminin on misli  $10^{-2}$  M potassium phosphate ve  $5 \times 10^{-4}$  M EDTA pH; 8 ile 1 gece dializ edilir. Dializ solüsyonu üç kere değiştirilir.

### III. Kademe: (Sephadex kolon kromatografisi)

Sephadex G-200 maddesi, 6 x 60 cm büyüklüğündeki kolonun hacmine göre hesaplanır ve 1 hacim sephadex 20-30 cc  $10^{-2}$ M potassium phosphate ve  $5 \times 10^{-4}$ M EDTA PH8 ile şişirilerek jel hazırlanır. Bu hazırlanan jel, dibine cam pamuğu yerleştirilmiş kolona doldurulur ve kolon aynı tampon ile uzun müddet yıkanarak dengeye getirilir.

Dializ sonunda elde edilen aktif çözelti, kolonun üstündeki tampon çözelti tamamen emildikten sonra jelin üzerine bir pipetle dikkatle yerleştirilir.

Dializ solüsyonu jele absorbe olduktan sonra, akışı temin için aynı tampon kullanılır. Bu akış, bütün proteinler kolondan uzaklaşana kadar devam eder.

Geçiş hızı 1-2 ml/dk olmalıdır. Daha yavaş olursa ayrılma iyi olmaz.

Rejenerasyondan sonra, aynı sephadex G-200 tekrar tekrar kullanılabilir.

Yüksek aktivitesi olan fraksiyonlar toplanır, bunlar umumiyetle kahverengi ve hafif bulanıktır. Dondurularak bir kaç gün saklanabilir.

Sonuçlar Sekil 1 de gösterilmiştir.

#### IV. Kademe: (Bentonitleme)

Sephadex elüsyonu ile öncül bentonit denemesi yapılır. Bunun için, çok az enzim fakat fazla miktarda protein absorplıyacak kadar bentonit kullanılır. (10-15 mg bentonit/mg protein) 3°C de 30 dk bekledikten sonra solüsyon santrifüj edilir.

Bir seri nümune içinde, en fazla enzim aktivitesi olanın bentonit miktarı, total hacım için hesaplanarak aktif fraksiyonun hepsi bentonitlenir. (12000 g/30 dk) santrifüjden sonra berrak ve sarı süpernatant biriktirilir ve 15 gün dondurularak saklanabilir.

V. Kademe: (DEAE kolon kromatografisi)

4 lt plazmadan toplanan aktif materyal, on misli hacimde  $10^{-2}$ M sodium citrate PH 4.45 tamponu ile bir gece dializ edilir. Dializ vasatı 4 defa değiştirilmelidir.

Aynı tamponla dengelenmiş 4 x 15 cm lik DEAE selüloz kolonu hazırlanır.

Dializ solüsyonu kolondan geçirilir ve aynı hacim citrate tamponu ile kolon yıkanır. Bu fraksiyonlar enzim ihtiva etmezler. Bu kademede kolondan, proteinin %90'ı çıkmış bulunur.

Konkav gradien ile yani gittikçe artan citrate tamponu konsantrasyonu ile kolona absorbe edilmiş olan aktif fraksiyon elüe edilir. 20-30 mM citrate konsantrasyonunda çıkmağa başlayan enzimin toplanması 40-45 mM civarında sona erer.

Fraksiyonlar 5-7 ml/dk hızla toplanır. Potassium bikarbonat ile nötralize edildikten sonra 1 ay saklanabilir.

Netice Şekil 2 de gösterilmiştir.



VI. Kademe: (ECTEOLA kolon kromatografisi)

8-12 lt. plazmadan toplanan materyal, on misli hacimde  $5 \times 10^{-2}$ M ammonium formate,  $5 \times 10^{-4}$ M EDTA PH 4.8'e karşı bir gece dializ edilir. Dializ mayii dört kere değiştirilir.

4 x 15 cm lik ECTEOLA selüloz kolonu aynı dializ tamponu ile hazırlanır, ve soğukta bir gece ağır ağır yıkanır. Dialize edilen solüsyon kolondan geçirilir ve eşit hacim format tamponu ile yıkanır. Bu yıkanan hacim içinde enzim bulunmaz.

Lineer gradien ile gittikçe artan ammonium format konsantrasyonu ile kolondaki madde elüe edilir ve yüksek aktivitedeki fraksiyon toplanır. (Sekil 3.)

Elüsyon hızı 4-5 ml/dk olmalıdır. Kolon elüatı bazik olduğundan nötralize etmeğe lüzum yoktur. Dondurulan fraksiyon bir hafta saklanabilir.

VII. Kademe:

20 lt. plazmadan toplanan materyal 5 mM sitrat tamponu ile PH 4.45 de dialize edilir.

1.5 x 1 cm lik DEAE selüloz kolonu V. kademedeki gibi hazırlanır ve 5 mM sitrat tamponu ile dengelenir. Dialize edilen solüsyon bu kolondan geçirilir ve eşit hacında ki tampon ile yıkanır. Fraksiyon içindeki enzimin %90-98'i kolona absorbe edilmiş olur. 500 mM sitrat tamponu ile kolon, 3-4 defa 1,5 cc lik hacim ile yıkanarak enzim toplanır.

Umumiyetle enzim, elüsyonun ilk 2-4 ml'si içinde 120.000 ü olacak şekilde toplanır. Rengi hafif sarıdır.

VIII. Kademe:

Her ml sinde 8-15 mg protein olan konsantre enzim solüsyonu, yüz misli hacimde 60% satüre ammonium sülfata karşı dializ edilir. Sonra dializat kapaklı küçük santrifüj tüplerine konur. Hafif bir bulanıklık görülene kadar ammonium sülfate ilâve edilir.

Solüsyon soğukta kristalizasyona bırakılır. Üç veya dört haftada ince tabakalar şeklinde kristaller teşekkül eder. (Şekil 4)

Purifikasyon ve verimin çeşitli kademeleri tablo I de gösterilmiştir.

**MUNAKAŞA:**

Yukarıda bahsedilen metod, daha önce ileri sürülen metodlardan çok daha üstündür. Çünkü, yüksek spesifik aktivite yani mümkün olduğu kadar düşük protein konsantrasyonuna mukabil, yüksek enzim aktivitesi elde edilebilmiştir. Verimi yüksek olup, bir kristalizasyon imkânına yol açmıştır<sup>(1,2,3,4)</sup>. Fazla miktar ionla enzimin stabilize veya aktive edilmesi bu saflaştırmayı mümkün kılmıştır.

Citrate ve yüksek konsantrasyonda ammonium ionu mevcudiyetinde enzimde belirli bir stabilite arzeder. Bu, ammonium sülfate içinde çeşitli kontaminantların sıcaklıkla denatüre olmasına ve sonradan enzimin daha kolay kromatografiye edilmesine ve saflaştırılmasına müsaade eder.

İleri kromatografik saflaştırma için başlangıçta Sephadex G-200 ve bentonit muamelesi ile protein miktarının azaltılması lâzımdır. Çok miktarda bentonit, celite, calcium phosphate enzimi absorbe eder. Bunlardan enzimi yeniden elüe etmek zor olur.

Citrate ile aktivasyona uygun olarak en spesifik purifikasyon bu anyonun DEAE selüloz gradienti ile elde edilir. Denenen 20 diğer iyon çok daha az tesirli bulunmuştur.

Enzimi yakından takip eden bir protein sadece citrate ile uzaklaştırılabilir. DEAE selüloz ile purifiye edilmiş enzimin daha fazla purifikasyonu için kullanılan Brushite, Dowex-2, ve CM-selüloz iyi netice vermemiştir. Diğer bir kontaminant, ancak ECTEOLA cellulose kromatografisi ile ayrılabilmiştir.

TEAE selüloz ve benzyl cellulose kromatografisi memnuniyet verici bulunmamıştır.

Eğer enzim solüsyonu çok dilüe edilirse veya düşük ionik kuvvetteki bir ortama karşı dializ edilirse veya aşırı köpüklenme olursa ana özelliklerin kayboluşuyla süratli bir inaktivasyon görülür, bu oda hararetinde daha barizdir.

Purifikasyon süresince enzim, aktivatörlerinden uzak tutulmamalıdır.

Her ne kadar EDTA daha iyi verim veririse de sisteine veya redükte glutation spesifik olarak korumaz. Bu belki de EDTA nın carboxilate olarak aktive edici tesirine bağlıdır.

## REFERENCES:

- 1) E.Stedman and E.Stedman, Biochem.J., 29 (1935), 2563.
- 2) D.M.Surgenor and D.Ellis, J.Am.Chem.Soc. 76 (1954), 6049.
- 3) D.M.Surgenor, L.E.Strong, H.L.Taylor, R.S.Gordon Jr.  
and D.M.Gibson, J.Am.Chem.Soc. 71(1949), 1223.
- 4) B.G.Malmström , O.Levin, and H.G.Boman, Acta Cham.Scand.  
10(1956), 1077.
- 5) Callahan S., LaDu B.N., Effect of ionic Strength on  
normal and atypical.
- 6) F.T.Evans, P.W.S.Gray, H.Lehmann, and E.Silk Lancet 1,  
(1952), 1229.
- 7) H.Harris, Proc.Roy. Soc. Med. 57(1964), 503.
- 8) P.T.Özand, A.M.Karahasanoglu, F.Tezcan and K.Emek, Se-  
cond Article Presented.
- 9) H.Nitschmann, P.Kistler and Largier, Helv.Chem.Acta.  
37(1954), 867.

- 10) P.Kistler, and H.Nitschmann, VoxSang. 7(1962), 414.
- 11) A.M.Karahasanoglu, and P.T.Özand, J.Lab. and Clin.Med  
70(1967), 343.
- 12) E.A.Peterson, and H.A.Sober in Methods in Enzymology.  
Vol V, Academic press, New York, 1962, p.3.
- 13) A.M.Karahasanoglu and P.T.Özand, Turk.J.Ped. 8(1966),1.
- 14) O.Warburg and W.Christian, Biochem. Z. 310(1941), 384.



Tablo 1

## Purifikasyonun özeti

Verilen değerler bir litreye göredir. Kademe 5 ve 8 deki değerler 1 lt. başlangıç materyaline göre extrapole edilmiştir.

FRAKSİYON	ÜNİTELER	PROTEİN mg	SPESİFİK AKTİVİTE Ünite/mg protein	ÜRÜN
Plazma	114 000	82 500	1.3	100
1. (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 0.575-0.70	95 000	14 800	6.4	83
2. Isıtma ve Dializ	72 000	14 800	5	63
3. Sephadex G-200 jel filtrasyonu	39 300	1 130	35	35
4. Bentonitle muamele	33 400	71	470	29
5. DEAE Cellulose Chromatografisi	26 700	10	2670	23
6. ECTEOLA Cellulose chromatografisi	17 600	4	4400	16
7-8. Kristaller	11 600	1.2	9650	10

Neticeler normal bir çalışma tarzını ifade etmektedir. Daha iyi ürün ve yüksek purifikasyon müteaddit defalar G-200 Sephadex elüsyonu ve cellulose chromatografileri ile elde edilir.

