

6
283814

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BİOKİMYA BÖLÜMÜ

PSEUDOKHOLINESTERASE'İN
ALLOSTERIC KİNETİK ÖZELLİKLERİ

Kimya Y. Mühendisi E. Ferhan TEZCAN

Doktora Tezi

1969



Hacettepe Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Biokimya Bölümü

PSEUDOCHEOLINESTERASE'IN
ALLOSTERIC KINETİK ÖZELLİKLERİ

Kimya Y. Mühendisi: E. Ferhan Tezcan

Doktora Tezi
1969

Çalışmalarına yön veren
Sayın Doç. Dr. Pınar Tefvik Özand'a
kıymetli yardımlarından dolayı
huzurlarınızda teşekkürü bir borç bilirim.

İ Ç İ N D E K İ L E R

	<u>Sayfa</u>
Ö Z E T	1
G İ R İ Ş	2
MATERYEL VE METOD	4
Materyel	4
Deney Sistemleri	4
Kontrol Denemeleri	5
NETİCELER	7
Süstrate Konsantrasyonu ve Hız Eğrisi	7
Modifier'ların Katalitik Aktivite Üzerine Etkisi	8
Choline ve Diğer Kuarterner Azot Birleşik- lerinin Etkisi	9
Anyonların Etkisi	13
Isının Katalitik Aktivite Üzerine Etkisi	37
Süstrat Hidrolizi ve Modifier'larla İlgili Kinetik Parametrelerin Grafik Metodlarla Hesaplanması	43
Süstrat'ın Modifier Olarak Etkisi	45
Modifier'ın Etkisi	49
TARTIŞMA	54
Sözlük	59
REFERANSLAR	61

Ö Z E T

1. Pseudocholinesterase'in sübstratlarına karşı "allosteric" bir protein olarak davrandığı bulundu ve Hill sabitleri de homolog sübstrat bağlanma mahalleri arasında "cooperative homotropic" bir interaksiyonun varlığını gösterdi.

2. Choline, Dibucaine ve diğer bazı kuarterner azot atomuna sahip birleşiklerin enzime en az iki mahalden bağlandığı; bu birleşiklerin düşük konsantrasyonlarında, enzim üzerinde özgül bir mahale bağlanarak, enzimi daha hızla çalıştıran modifiye şekle döndürdüğü; yüksek konsantrasyonlarında ise aktif merkezde sübstratı "competitive" olarak inhibe ettikleri bulundu.

3. Bazı anyonların, öncelikle citrate'ın enzimin özgül bir aktivatörü olduğu ve enzim üzerinde bu anyonların bağlanabileceği en az iki bağlanma mahallinin varlığı tespit edildi.

4. Aktivasyona veya inhibisyona sebep olabilecek konsantrasyonda "modifier" ihtiva eden bir ortamda, 45°C'a kadar ısıtılan enzimin: yapısını muhafaza ettiği veya irreversible olarak inaktive edildiği gözlemlendi.

5. Enzim "modifier" ihtiva etmeyen bir ortamda 45°C'a kadar ısıtılarak "desensitize" edildi ve desensitize enzimin Michaelis Menten kinetiklerini gösterdiği, tekrar aktive edilemediği, fakat "modifier" ler tarafından "competitive" olarak inhibe edilebildiği gösterildi.

G İ R İ Ş

Serum Cholinesterase'ının yani Pseudocholinesterase'ın (acylcholineacylhidrolase EC 3.1.1.8)'ın fizyolojik görevi tam olarak bilinmemektedir. Bu enzimin fonksiyonunu aydınlatmak gayesi ile bölümümüzde yapılan çalışmalar esnasında enzimin saflaştırılması ve kristalizasyonu başarılmıştır.⁽¹⁾

La Du⁽²⁾ ve arkadaşları Pseudocholinesterase'ın (PCE) phosphate tarafından aktive edildiğini göstermişlerdi. Fakat çalışmalarında benzoylcholine hidrolizinin ve phosphate aktivasyonunun mahiyetini araştırmamışlardı. Harris ve arkadaşları⁽³⁾ diğer bir anyonu, fluorürü inhibitör olarak bildirmişler ve fluorüre insensitve insan PCE varyantlarını⁽²⁻⁵⁾ tarif etmişlerdi. Bununla beraber bu birleşiklerin tesir mekanizmaları ile ilgili etraflı bir kinetik araştırma yapılmamıştı. Bu konuda yapılacak ikna edici bir çalışmanın, şimdiye kadar fizyolojik rolü tam olarak anlaşılamayan bu enzim hakkında, yeni bulgulara yol açacağı tabiidir.

Bu tezde takdim edilen kinetik çalışmalar enzimin "allosteric" bir davranış gösterdiğini ortaya koymakta, enzim üzerinde aktif merkez dışında bazı "modifier"ların bağlanmasına müsaade eden ayrı bağlanma mahallerinin varlığını göstermektedir.

Enzimin, uygun şartlarda ısıtılarak "desensitize" edilebildiği ve bütün "allosteric" karakterlerini kaybettiği gözlenmiştir.

Bu çalışmalarla enzimin inhibitörleri ve iki grup altında toplayabileceğimiz bir sıra "allosteric" aktivatörü tesbit edildi.

1. Kuarterner azot atomu ihtiva eden birleşikler (cholin ve türevleri),
2. Anyonik karakter gösteren birleşikler.

Neticede karboksil grupları cis durumunda olan polikarboksilatların enzimin en kuvvetli aktivatörleri olduğu ortaya çıktı. Bu bulgu da enzimin, bir polikarboksilat birleşiminin metabolizması ile yakından ilgili fizyolojik bir görev gördüğünü telkin etmektedir.

MATERYEL VE METOD

MATERYEL:

Tecrübeler bölümünde saflaştırılan insan serum pseudo-cholinesterase'ı⁽¹⁾ ile yapıldı. 24 saat 1-3°C da deionize suya karşı dialize edilen ve derhal küçük miktarlar halinde dondurulan enzim preparatları (çözülüp tekrar dondurulmamak üzere) iki hafta içersinde kullanıldı.

Çözeltiler deionize su ve kimyasal olarak saf (C.P. Grade) maddelerle hazırlandı. Sübstratlar, kationik aktivatörler ve inhibitörler Dowex 2-200 Butyrate kolonları kullanılarak butyrate tuzları haline çevrildi ve nihai pH'ları butyric asitle pH = 5,9'a ayarlandı. Bütün anyonlar ve DTNB[×] sodium tuzları halinde hazırlandı.

Butyric asit, saf tributyrin'in hidrolizi ve fraksiyonlu distilasyonu ile veya n-buthanol-chromic asid karışımı kullanılarak elde edilen preparatın müteaddit defalar distilasyonu ile elde edildi.

Sübstratların, butyric asidin ve bazı "modifier"ların saflığı TLC[×] tekniği ile kontrol edildi.

DENEY SİSTEMİ:

Standart şartlarda⁽⁶⁾, çeşitli sübstratlar için bulunan aktivite spektrumu, pürifiye enzim ve normal insan serumu kullanıldığında aynıdır. Bu sebepten çalışmalarda spektrofotometrede en hassas olarak tayin edilebilen BTC ve BC butyrate'ın hidrolizi tetkik edildi.

× Kısaltmalar: DTNB : 5,5'-dithio bis-(2 nitro benzoic acid)
BTC: Butyrylthiocholine; BC: benzoylcholine; TLC: Thin Layer Chromatography.

Enzimatik tayinler spektrofotometrik olarak 30°C'da yapıldı ve tayin için kuvvet odası devamlı sınırlı dolaşımı ile sabit ısıda tutulabilen bir Zeiss PMQ II spektrofotometre kullanıldı. Deneyler her bir nokta için en az iki veya üç defa tekrarlandı. Bu şekilde tekrarlanan denemelerin ilk hızlarının ortalamaları, vasatî ilk hız olarak kullanıldı.

BTC butyrate hidrolizi için kullanılan metod Elman⁽⁷⁾ tarafından teklif edilen metodun modifiye şeklidir.

Deney sistemi olarak pH= 5,9 da 10^{-3} M Sodyum Butyrate, $2,5 \cdot 10^{-5}$ M DTNB, çeşitli konsantrasyonlarda BTC butyrate, optimal miktarda enzim ve "modifier" (sodyum veya butyrate tuzu şeklinde) ihtiva eden bir sistem; kör kuvveti olarak da enzim haricinde bütün komponentleri ihtiva eden bir kuvvet kullanıldı.

BTC'nin hidrolizi ile açığa çıkan Thio Choline, renk reaktifi olarak ortama ilâve edilen 5-5'-Dithio Bis-(2 Nitro Benzoic acid (DTNB)'i redükler. Enzim hızı teşekkül eden redükte sarı renkli DTNB'nin 412 m μ . da Spektrofotometrede takibedilmesi ile ölçülür.

BC Butyrate'ın hidrolizi için kullanılan metod ise Kalow'un⁽⁴⁾ teklif ettiği metodun modifiye şeklidir. Deney sistemi olarak pH=5,9'da 10^{-3} M sodyum Butyrate, çeşitli konsantrasyonlarda BC butyrate ve yukarıda anlatıldığı şekilde hazırlanmış "modifier", optimal miktarda enzim ihtiva eden bir sistem kullanıldı ve ölçüm 240 m μ .da Spektrofotometrede yapıldı.

KONTROL DENEMELERİ:

Tertiplenen kontrol denemeleri ile enzime büyük sayıda birleşimin etki ettiği görüldü. Ortamdaki muhtemel aktivatörlerin ionik tesirlerini minimal miktara indirebilmek için; deney sistemleri substrat ve renk reaktifinin total konsantrasyonu (pH= 5,9'da) 10^{-5} M konsantrasyonu geçmiyecek şekilde tertip edildi.

Denemelerde ilk hızların ölçülmesi sırasında ortam pH'sında meydana gelen değişiklik 0,05 pH ünitesinden daha azdı ve umumiyetle ortam çalışılan anyon tarafından pH=5,9 da tamponlandı.

Sodium Butyrate enzime etkisi en az olan birleşiklerden biridir ve 10^{-5} M - 10^{-2} M. konsantrasyonda enzim hızına etkilemez. Bazı birleşiklerin enzim üzerine olan etkisi incelenirken sodium butyrate tampon olarak kullanılmış ve 10^{-3} M sodium butyrate konsantrasyonu bu iş. için uygun görülmüştür.

Denemeler pH= 5,9'da yapılmıştır. Buna sebep hava CO_2 inin çözeltilerde çözünmesi ile meydana gelen HCO_3^- anyonunun yüksek konsantrasyon ve yüksek pH'da enzimin en kuvvetli aktivatörlerinden biri olmasıdır. Radioaktif $C^{14}O_2$ ile doyurulmuş bir ortamda, pH= 5,9'luk çeşitli tampon sistemleri bırakılarak, çözünen maksimum $C^{14}O_2$ miktarı araştırılmış ve bu miktarın pH=5,9'da $1,5 \cdot 10^{-6}$ M.dan daha yüksek olmadığı görülmüştür. Aynı konsantrasyonda HCO_3^- ihtiva eden bir deney ortamında pH=8'de dahi önemli bir aktivasyon yoktur.

N E T İ C E L E R

SÜBSTRAT KONSANTRASYONUNA BAĞLI OLARAK ELDE EDİLEN HIZ EĞRİSİ:

Şekil 1 A'da görülen eğri, Michaelis-Menten denkleminden beklendiği gibi bir hiperbol olmayıp, sigmoid bir eğridir ve enzimle sübstratı arasında "allosteric" bir "interaction" un varlığını telkin etmektedir. Gerçekten de $1/v$ nin $1/s$ 'e göre grafiklenmesi linear bir doğru yerine yukarı doğru konkav bir eğri verir (Şekil 1 B).

Bunun birkaç şekilde izahı olabilir:

a) Böyle bir müşahede sübstratın safsızlık⁽⁸⁾ ihtiva etmesine bağlı olarak görülebilir. Fakat aynı netice BTC ve BC butyrate'ın herikisi için ve ayrıca kromotografik olarak saf sübstratlar kullanıldığında da elde edilmiştir.

b) Bir diğer ihtimal ortamda farklı kinetik özelliklere sahip iki veya daha fazla enzimin bulunması ihtimalidir.

Normal serum karışımları veya tek şahsa ait normal plasma ile; enzim purifikasyonu sırasında çeşitli kademelerden alınan numuneler ile; elektroforez'de gözlenen band'lara ait numuneler ve Sephadex G-200 gel filtratı numuneleri ile kinetik tecrübeler tekrarlandığında bütün bu numunelerin sübstrat ve "modifier" lara^(9,10) karşı kinetik davranışlarının aynı olduğu görülmüş ve çalışmalardan elde edilen kinetik sabitler arasında mühim bir fark bulunamamıştır.

c) Üçüncü bir ihtimal olarak yüksek konsantrasyondaki sübstratın, enzim aktivitesini (nonspesifik olarak), sadece iyonik etkisi ile etkilediği düşünülebilir. Daha evvel kontrol tecrübelerinden münakaşa edildiği gibi, ortamda başka "modifier"ların bulunmadığı ve hattâ kısıtlı sübstrat konsantrasyonunda çalışıldığı düşünülürse, sübstratın kendisinin bir "modifier" olarak rol oynadığına hükmedilir.

Bütün bu gözlemler enzimin süstrata "allosteric" olarak etki etmesi ile izah edilebilir.

Buna göre enzim üzerinde süstratın bağlanabileceği iki mahal vardır:

1. Aktif merkez,
2. Başka kinetik karakterlere sahip bir aktif merkez veya modifier'ın bağlanabileceği bir mahal.

Frieden'e⁽¹¹⁾ göre hesaplanan BTC ve BC hidrolizi ile ilgili kinetik sabitler (Tablo I) de gösterilmiştir. Hesaplanan Hill sabitleri⁽¹²⁾ de BTC için $n=1,45$ ve BC için $n=1,20$ dir. Bu değerler sadece "allosteric" bir proteinden beklenebileceği gibi, süstrat'ın "cooperative homotropic" etkisini gösterir ($2 > n > 1$).

"MODIFIER" LARIN KATALİTİK AKTİVİTE ÜZERİNE ETKİSİ:

Ortama bir "modifier" ilâvesi hız eğrisini etkiler. Eğer bu bir inhibitör ise, "allosteric" bir proteinden beklenebileceği gibi sigmoid eğri daha da bârizleşir (-Dibucaine Şekil 1 A). Halbuki optimum konsantrasyonda bir aktivatörün ilâvesi ise, sigmoid eğrinin silinmesine ve alışılmış hiperbolik hız eğrisinin açığa çıkmasına sebep olur (Choline, Şekil 1 A).

Bu tesirler Lineweaver Burke grafiklerinin çizilmesi ile çok daha iyi bir şekilde müşahede edilir (Şekil 1 B).

"Modifier" lar etkilerine göre iki grup altında incelenebilir: Choline ve diğer kuarternar azot birleşikleri ve çeşitli anyonlar.

Choline ve Diğer Kuarternler Azot Birleşiklerinin Etkisi:

Genel olarak bu grup birleşiklerin katalitik aktiviteye etkileri aynıdır. Düşük konsantrasyonda aktivasyona sebep olurlar, yüksek konsantrasyonda ise enzimi inhibe ederler. Dibucain'in BC butyrate hidrolizine etkisi, bu konuda iyi bir örnektir (Şekil 2).

Decamethenium (R02-0863) de BTC ve BC butyrate'ın hidrolizini aynı tarzda etkiler.

Choline ve choline analogları da aynı tesiri gösterirler, fakat inhibitör olarak etki edebilmeleri için ortamda çok yüksek konsantrasyonda bulunmaları şarttır.

Anlatılan ikili tesirin olabilmesi enzim üzerinde bu birleşiklerin bağlanabileceği iki mahallin bulunması ile mümkündür. Birinci bağlanma mahalli, düşük konsantrasyonlarında "modifier" ı bağlar ve enzimin farklı kinetik karaktere sahip, hidroliz hızı daha fazla olan bir yapıya dönüşmesine yol açar.

İkinci mahal ise aktif merkezdir ve yüksek "modifier" konsantrasyonunda, bu mahal için sübstrat ve "modifier" "competitive" inhibisyona girerler. Gerçekten (Şekil 1 B) ve (Şekil 2) de görüldüğü gibi sübstrat konsantrasyonunun artması bu birleşikler tarafından meydana gelen "competitive" inhibisyonun azalmasına sebep olur.

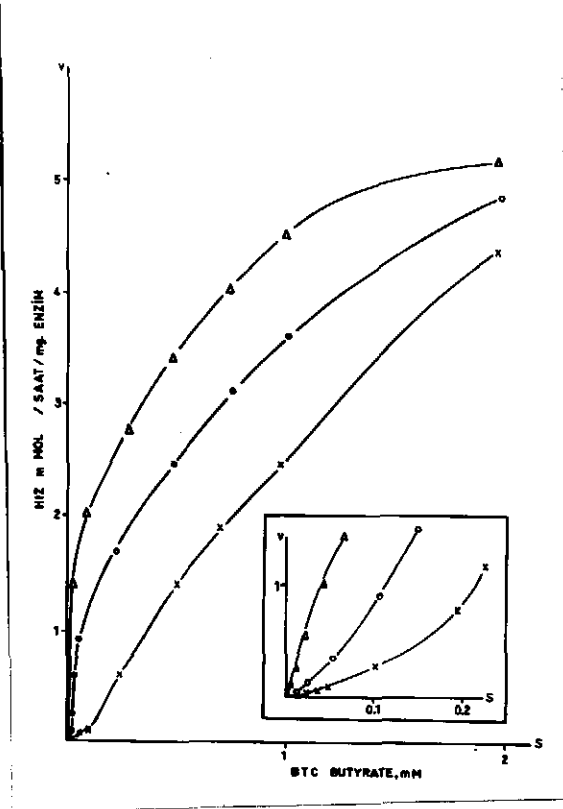
Bu grup birleşiklerden sadece cholin fizyolojik aktivatördür. Nisbeten düşük konsantrasyonları dahi aktivasyona sebep olur ve inhibitör etkisi sadece çok yüksek konsantrasyonlarında gözlenir (Şekil 5).

Frieden ve Ogston^(11,13) tarafından çıkartılan kinetik eşitliklerle hesaplanan bu "modifier" larla ilgili kinetik parametreler (Tablo II) de gösterilmiştir. Bu parametrelerin hesabı için, yeni bir kinetik grafik metodu kurulmuş ve gerek sübstrat, gerek bu grup birleşikler, gerekse diğer grup "modifier" lara ait kinetik parametrelerin grafik hesap metodu, neticeler bölümünün sonunda, ayrıca sunulmuştur.

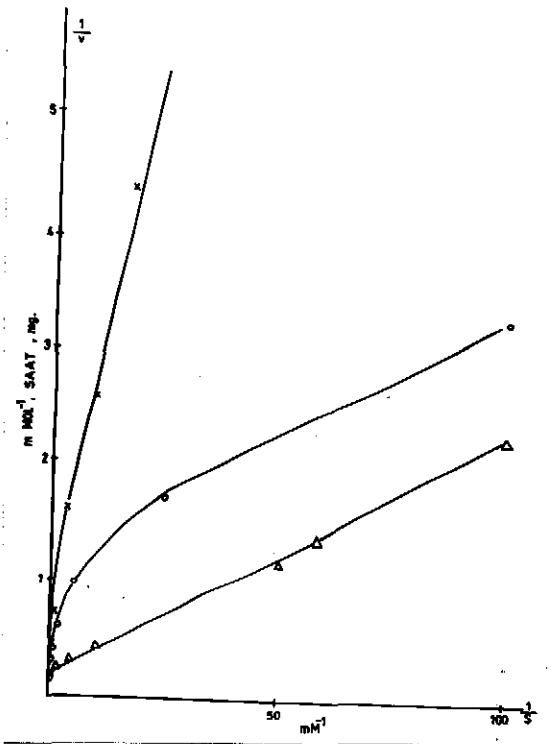
Şekil 1 A. Sübstrat konsantrasyonuna bağlı olarak elde edilen hız eğrisi:

- (o) Ortamda sübstrattan başka "modifier" yoktur.
- (x) Ortam sübstrata ilâveten 10^{-5} M. Dibucaine ihtiva eder.
- (Δ) Ortam sübstrata ilâveten 5.10^{-3} M Choline Butyrate ihtiva eder.

Sağ taraftaki kare içersindeki eğriler, absis değerlerinin dört defa büyütülmesi ile elde edilmiştir ve eğrilerin ilk kısımlarını gösterir.



Şekil 1 B. (Şekil 1 A) ile verilen grafiklerin
Lineweaver-Burke eğrileri.

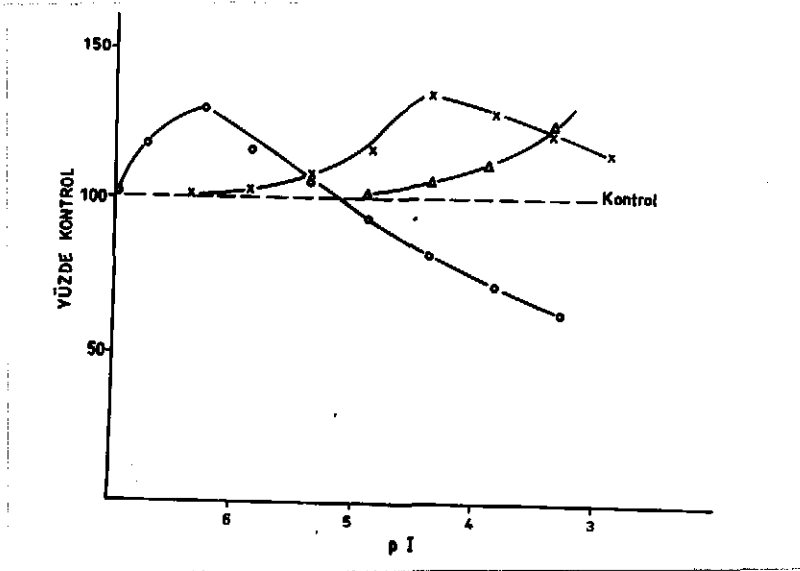


Şekil 2. BC Butyrate hidroliz hızı üzerine Dibucaine-
in ikili etkisi. Grafik, kontrol değerlerinden hesaplanan
hidroliz yüzdesi ile pI (- log inhibitör konsantrasyonu)
arasında çizilmiştir.

(o) BC Butyrate 10^{-5} M.

(x) BC Butyrate $3,3 \times 10^{-5}$ M.

(Δ) BC Butyrate 10^{-4} M.



Anyonların Etkisi:

Anyonların PCE üzerine olan etkisi bir seri anyon kullanılarak incelenmiştir (Tablo III); (Tablo IV); (Tablo V).

Tablo III

Tabloda (mutlak miktar) olarak verilen değerler: 3x3 mg gr. saf enzimin, oda temperaturünde, 20 dakikada BTC'i hidrolizi ile meydana gelen redükte DTNB'nin 412 mg da Beckmann DU spektrofotometresinde verdiği 10^3 x O.D. olarak değeridir.

Tabloda (%) olarak verilen değerler: En yüksek mutlak miktar yüz kabul edilerek diğer mutlak miktarların hesaplanması ile elde edilmiştir.

Tabloda (Faktör) olarak verilen değerler: Farklı zamanlarda, farklı dilüsyonlarda enzim preparatları kullanılarak çalışılan deney sistemlerinin sonuçları ile aynı enzim preparatı ve $5 \cdot 10^{-4}$ M aktive edici madde ihtiva eden denemelerin tekrar çalışılması ile elde edilen sonuçların birbirlerine oranından elde edilmiştir.

Birleşik grubu: Carboxylic Acid.

Birleşik grubunun genel yapısı: Monocarboxylic Acid.

Çalışılan tuz tipi: Sodium tuzu.

Deneyde kul- lanılan Aktivatör Konsantras. x M	Faktör:1,32		Faktör:0,98		Faktör:1,04		Faktör:1,12	
	Formate		Acetate		Propionate		Butyrate	
	Mutlak miktar	%	Mutlak miktar	%	Mutlak miktar	%	Mutlak miktar	%
5×10^{-5}	11,8	33	12,7	29	25	53	30,2	100
10^{-4}	13,2	37	14,7	37	24,3	53	31,3	100
2×10^{-4}	14,5	40	-	-	27	59	31,3	100
5×10^{-4}	25	70	17,6	40	27	59	31,3	100
10^{-3}	27,7	78	21,5	49	30	67	30,2	100
2×10^{-3}	22,4	63	24,5	55	30	67	31,3	100
5×10^{-3}	35,6	100	28,4	64	38,5	84	33,6	100
10^{-2}	25	70	27,4	62	37	83	30,2	100
2×10^{-2}	27,7	78	33,3	76	40,7	90	31,3	100
10^{-1}	29	80	44,1	100	45,7	100	-	-

Birleşik grubu: Carboxylic Acid

Birleşik grubunun genel yapısı: α -Amino mono Carboxylic Acid

Çalışılan tuz tipi: Sodium tuzu

Deneyde kullanılan Aktivatör Konsantras. x M	Faktör:0,92 Glycine		Faktör:0,92 Alanine		Faktör:0,92 Valine		Faktör:	
	Mutlak miktar	%	Mutlak miktar	%	Mutlak miktar	%	Mutlak miktar	%
5×10^{-5}	24,8	56	36,8	89	18,4	100	-	-
10^{-4}	25,7	59	37,7	91	17,5	100	-	-
2×10^{-4}	25,7	59	37,7	91	17,5	100	-	-
5×10^{-4}	25,7	59	40,5	98	17,5	100	-	-
10^{-3}	25,7	59	41,4	100	17,5	100	-	-
2×10^{-3}	26,7	61	39,5	96	17,5	100	-	-
5×10^{-3}	33	78	38,6	94	20,2	100	-	-
10^{-2}	42,3	98	29,4	71	18,4	100	-	-
2×10^{-2}	43,2	100	27,6	66	18,4	100	-	-
10^{-1}	36,8	86	-	-	-	-	-	-

Birleşik grubu: Carboxylic Acid

Birleşik grubunun genel yapısı: α -Hydroxy Carboxylic Acid

Çalışılan tuz tipi: Sodium tuzu

Deneyde kullanılan Aktivatör Konsantrasy. x M	Faktör:1,04 Glycolate		Faktör: 1 Lactate		Faktör: 1 α -Hydroxy- Butyrate		Faktör:	
	Mutlak miktar	%	Mutlak miktar	%	Mutlak miktar	%	Mutlak miktar	%
5×10^{-5}	20,8	57	54	100	21	84	-	-
10^{-4}	21,8	64	52	97	21	84	-	-
2×10^{-4}	24,9	75	47	87	21	84	-	-
5×10^{-4}	28	82	53	98	25	100	-	-
10^{-3}	33,3	100	52	97	22	88	-	-
2×10^{-3}	22,9	68	42	78	21	84	-	-
5×10^{-3}	19,7	57	41	76	18	71	-	-
10^{-2}	18,7	53	-	-	14	56	-	-
2×10^{-2}	11,4	33	32	59	12	48	-	-

Birleşik grubu: Carboxylic Acid

Birleşik grubunun genel yapısı: Di Carboxylic Acid

Çalışılan tuz tipi: Sodium tuzu

Deneyde kullanılan Aktivatör Konsantras. <u>x M</u>	Faktör:1,28 <u>Succinate</u>		Faktör:1,285 <u>Glutarat</u>		Faktör:1,214 <u>Adipat</u>		Faktör:	
	Mutlak miktar	%	Mutlak miktar	%	Mutlak miktar	%	Mutlak miktar	%
5×10^{-5}	39,7	63	39,8	70	23	60	-	-
10^{-4}	39,7	63	39,8	70	23	60	-	-
2×10^{-4}	39,7	63	39,8	70	24,3	63	-	-
5×10^{-4}	39,7	63	42,4	75	24,3	63	-	-
10^{-3}	39,7	63	42,4	75	24,3	63	-	-
2×10^{-3}	42,2	65	50,7	90	25,5	66	-	-
5×10^{-3}	48,6	75	55,2	97	35,2	90	-	-
10^{-2}	55	85	56,5	100	35,2	90	-	-
2×10^{-2}	62,7	95	51,4	91	38,8	100	-	-
10^{-1}	65,3	100	-	-	-	-	-	-

Birleşik grubu: Carboxylic Acid

Birleşik grubunun genel yapısı: Tricarboxylic Acid ve α -keto di Carboxylic Acid

Çalışılan tuz tipi: Sodium tuzu

Deneyde kul- lanılan Aktivatör Konsantras. x M	Tri Carboxylate		α -keto dicarboxylate					
	Faktör:1,48 Citrate		Faktör:1,75 Oxaloacetate		Faktör:1,28 α -keto glu- tarate		Faktör:	
	Mutlak miktar	%	Mutlak miktar	%	Mutlak miktar	%	Mutlak miktar	%
5×10^{-5}	23,68	24	33,25	23	39,68	89	-	-
10^{-4}	25,16	25	33,25	23	35,84	82	-	-
2×10^{-4}	32,56	32,5	33,25	23	35,84	82	-	-
5×10^{-4}	29,6	29,6	42	29	37,12	85	-	-
10^{-3}	32,56	32,5	42	29	37,12	85	-	-
2×10^{-3}	34,04	34	57,75	41	35,84	82	-	-
5×10^{-3}	100,64	100	100,55	76	37,76	86	-	-
10^{-2}	85,84	85,8	127,75	189	43,52	100	-	-
2×10^{-2}	84,36	84,3	143,5	100	43,52	100	-	-
10^{-1}	-	-	-	-	38,4	89	-	-

Birleşik grubu: Noncarboxylate'lar

Deneyde kullanılan Aktivatör x M	Faktör: 0,93 KPO ₄		Faktör: 1 Sodium Arsenate		Faktör: 1 Sodium Bicarbonate		Faktör:	
	Mutlak miktar	%	Mutlak miktar	%	Mutlak miktar	%	Mutlak miktar	%
5x10 ⁻⁵	16,7	26	6,5	50	34	24	-	-
10 ⁻⁴	18,6	29	6	46	36	25	-	-
2x10 ⁻⁴	18,6	29	6,5	50	38	27	-	-
5x10 ⁻⁴	22,3	35	8	61	43	30	-	-
10 ⁻³	27,9	42	8	61	44	31	-	-
2x10 ⁻³	26	41	8	61	49	35	-	-
5x10 ⁻³	51	73	13	100	106	76	-	-
10 ⁻²	63,2	100	13	100	126	90	-	-
2x10 ⁻¹	59,5	94	9	69	139	100	-	-

Birleşik grubunun genel yapısı: Tetra carboxylate

Çalışılan tuz tipi: Sodium tuzu

Deneyde kullanılan Aktivatör Konsantras. x M	Faktör:1,17		Faktör:		Faktör:		Faktör:	
	EDTA							
	Mutlak miktar	%	Mutlak miktar	%	Mutlak miktar	%	Mutlak miktar	%
5×10^{-5}	11,7	29	-	-	-	-	-	-
10^{-4}	14	35	-	-	-	-	-	-
2×10^{-4}	17,5	44	-	-	-	-	-	-
5×10^{-4}	23,4	58	-	-	-	-	-	-
10^{-3}	24,5	61	-	-	-	-	-	-
2×10^{-3}	26,9	67	-	-	-	-	-	-
5×10^{-3}	39,8	100	-	-	-	-	-	-
10^{-2}	39,8	100	-	-	-	-	-	-
2×10^{-1}	37,4	94	-	-	-	-	-	-

Tablo IV

<u>Grup</u>	<u>Aktivasyon oranı</u>	<u>Birleşik adı</u>
I	4 defadan fazla	Citrate Oxaloacetate Bicarbonate
II	3,5-4 defa	Potassium Phosphate
III	3-3,5 defa	Formate Acetate
IV	2,5-3 defa	Maleate EDTA
V	2-2,5 defa	Arsenate
VI	1,5-2 defa	Propionate Glycine Glycolate Succinate Adipate
VII	1-1,5 defa	Glutarate α -Keto Glutarate α -Hydroxy Butyrate Alanine
VIII	Hiç aktive etmeyenler	Fumarate Pyruvate Valine Caproate Valerate Butyrate

İki veya daha fazla aktive eden aktivatörlerde % 100 aktivasyon veren konsantrasyon

<u>Birleşik adı</u>	<u>Aktivite % 100 olduğundan kons.</u>
Citrate	5×10^{-3}
Oxalo Acetate	2×10^{-2}
Bicarbonat	2×10^{-1}
Phosphate	10^{-2}
Formate	5×10^{-3}
Acetate	10^{-1}
Maleate	2×10^{-2}
EDTA	5×10^{-3}
Arsenate	10^{-2}

Citrate, EDTA, Formate, < Phosphate, Arsenate < Oxaloacetate, Maleate < Acetate < Bicarbonat.

İki veya daha fazla aktive eden aktivatörlerde yüzde yüz aktivasyonda, gözlenen hızların büyüklük sırasına göre dizimi:

Oxaloacetate > Citrate > Maleate > Phosphate > EDTA > Acetate > Formate > Arsenate.

Tablo V

1) Noncarboxylate'lar:

Phosphate > Arsenate

2) Bicarbonate: En kuvvetli aktivatörü.

3) R-CH₂-CH₂-COOH:

Acetate > Formate > Propionate

Butyrate, Valerate, Caproate, etkisiz.

4) COOH-(CH₂)_n-COOH:

Succinate = Adipate > Glutarate

Succinate < Propionate << Acetate

5) COOH-CH=CH-COOH:

(Cis) Maleate >> (trans) Fumarate

Maleat ≈ Acetate

6) A-Tricarboxylate:

Citrate >> diğerleri

Citrate = Bicarbonate > Acetate.

B-Tetracarboxylate: EDTA

Citrate > EDTA ≈ Maleate.

7) α -Substituentler:

A- α -Amino Monocarboxylate'lar.

Glycine } Alanine

Valine etkisiz

Glycine \equiv Propionate

B- α -Hydroxy Monocarboxylate'lar.

Glycolate } α -Hydroxy Butyrate

Lactate inhibitör.

Glycolate \equiv Propionate.

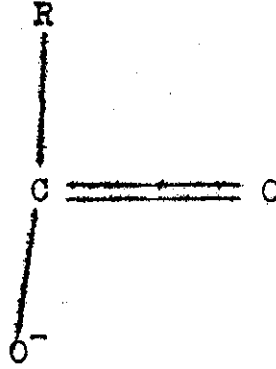
C- α -Keto Noncarboxylate'lar.

Moleküller etkisiz kalıyor.

D- α -Keto Dicarboxylate'lar.

Oxaloacetate } Maleate

α -Keto Glutarate etkisiz.



Aktivasyon, yukarıdaki grubun 2,3,4 defa tekrarlanması ve bu grupların cis konformasyonu nisbetinde artar.

Şema I.

Tecrübelerden elde edilen neticeler şu şekilde özetlenebilir:

- I) Ordinata yüzde olarak hız (en fazla gözlenen hız 100 kabul edilerek), absiste aktivatör konsantrasyonunun negatif logaritması işaretlenerek çizilen grafiklerde (Şekil 3) deki eğri elde edilir.
- II) Mono Carboxylate'lardan formate, acetate, propionate enzime aktivatör etkili, butyrate'tan itibaren butyrate, valerate ve caproate etkisiz; α -Keto monocarboxylate'lardan pyruvate etkisiz, Glycoxilate, α -keto iso valerate aktivatör etkili; α -Amino mono carboxylate'lardan glycine, alanine aktivatör etkili, valine etkisiz; α -Hydroxy mono carboxylate'lardan glycolate, α -hydroxy butyrate aktivatör etkili; lactate ise etkisiz olarak bulunmuştur.

Dicarboxylate'lardan succinate glutarate, adipate aktivatör etkili, doymamış dicarboxylate'lardan cis konfigürasyonda olan maleat aktivatör etkili, trans konfigürasyonundaki fumarate etkisiz; α -keto dicarboxylate'lardaki oxaloacetate, α -keto glutarate aktivatör etkili, tricarboxylate'larda citrate ve tetra carboxylate'larda (EDTA) aktivatör etkili; non carboxylate'lardan KPO_4 arsenate ve yüksek pH'da $NaHCO_3$ in aktivatör etkili olduğu bulunmuştur.

- III) Citrate, oxaloacetate ve bicarbonate'in enzimi 4; Potassium phosphate'in 3,5-4; formate, acetate'in 3-3,5; maleate ve EDTA'nın 2,5-3 defa, arsenat'ın 2-2,5; propionate, glycine, glycolate, succinate ve adipatın 1,5-2; Glutarate, α -keto glutarate, α -hydroxy butyrate, α -keto iso valerat, alanine ve glycoxilate'in 1-15 misli aktive ettiği fumarate, pyruvate, valine, caproate, valerate ve butyrate'in ise enzim aktivasyonuna etkisiz olduğu bulunmuştur.

IV) Kimyasal yapılarına göre kullanılan maddeler sınıflandırılır, ve aktivasyon oranları mukayese edilirse, non carboxylate'lardan phosphate'ın arsenate'tan; monocarboxylate'lardan acetate'ın fumarate'dan fumarate'ın propionate'tan; dicarboxylate'lardan succinate ve adipate'ın glutarate'dan doymamış dicarboxylate'lardan maleate'ın fumaric acid'den tricarboxylate'lardan citrate'ın bütün diğer maddelerden (EDTA ve maleate dahil) α -aminomonocarboxylate'lardan glycine'ın alanine'den α -OH monocarboxylate'lardan glycolate'ın α -OH butyrate'tan daha iyi aktivatör oldukları bulunmuştur.

Yukardaki tecrübelerle dayanarak anyonlar iki grup altında incelenebilir : a) Aktivatörler, b) İnhibitörler.

Aktivator Anyonlar.:

Aktivator anyonların sayısı çok fazladır ve bunların enzim üzerine olan etkileri (Şekil 3 A) ile, citrate'ın enzim üzerine olan etkisi örnek olarak verilerek, grafiklenmiştir. Görüldüğü gibi optimum bir konsantrasyonda aktivasyon maximumdur. Bununla ilgili kinetik parametreler (Tablo II) de verilmiştir.

Aktivator anyonlar, choline ve choline analogları için, optimum aktivasyonu veren konsantrasyonlarla, optimum ion konsantrasyonundaki aktivasyon derecelerinin grafiklenmesi ile (Şekil 4) elde edilmiştir. Optimum ion konsantrasyonundaki aktivasyon derecesi $k_{10}e_0s / K_9$ terimiyle; optimum aktivasyonu veren konsantrasyon da K_7K_{12} terimiyle ilgilidir ve bu sebepten "modifier"ın enzime özgül bir mahalden bağlandığına delil teşkil ederler.

Citrate oxaloacetate ve bicarbonate haricindeki anyonların aktivasyon dereceleri yüksek değildir, aynı zamanda optimum aktivasyonu veren konsantrasyonları da fizyolojik sınırların dışındadır.

Citrate ve oxaloacetate yüksek pH'da da iyi birer aktivatördürler, fakat bu tesirleri bicarbonate kontaminasyonu sebebiyle tatminkâr bir şekilde ölçülemedi.

Şekil 4'de verilen yüksek pA değerlerinin düşündürdüğü gibi, aktivator anyonların pek çoğunun dissosiyasyon sabitleri yüksektir (citrate ve oxaloacetate hariç). Bu sebepten bu ikinci grup birleşiklerle, enzim arasında ancak non spesifik bir "interaction" un varlığı düşünülebilir.

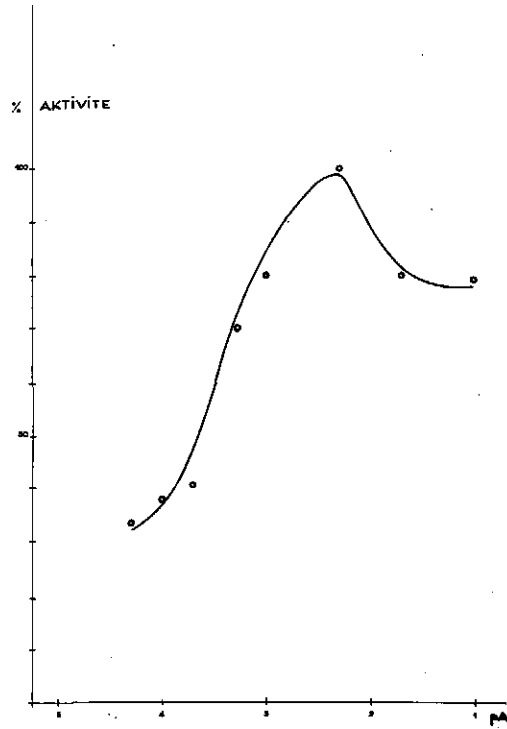
Citrate haricindeki Krebs siklusu intermedierleri enzimi aktive etmezler veya yüksek konsantrasyonlarında aktive edebilirler. Bütün bu bulgulardan citrate'in ve muhtemelen oxaloacetate'in enzimin spesifik "modifier"ları olduğu neticesine varılır.

Yüksek konsantrasyonda aktivasyonun tedricen azalması, enzim üzerinde citrate'in bağlanabileceği en az iki yerin varlığına delildir. Bir tanesi anyonun düşük konsantrasyonlarında bağlandığı "allosteric" "modifier" mahalli, ikincisi ise muhtemelen yüksek konsantrasyonlarında bağlanabildiği aktif merkezdir.

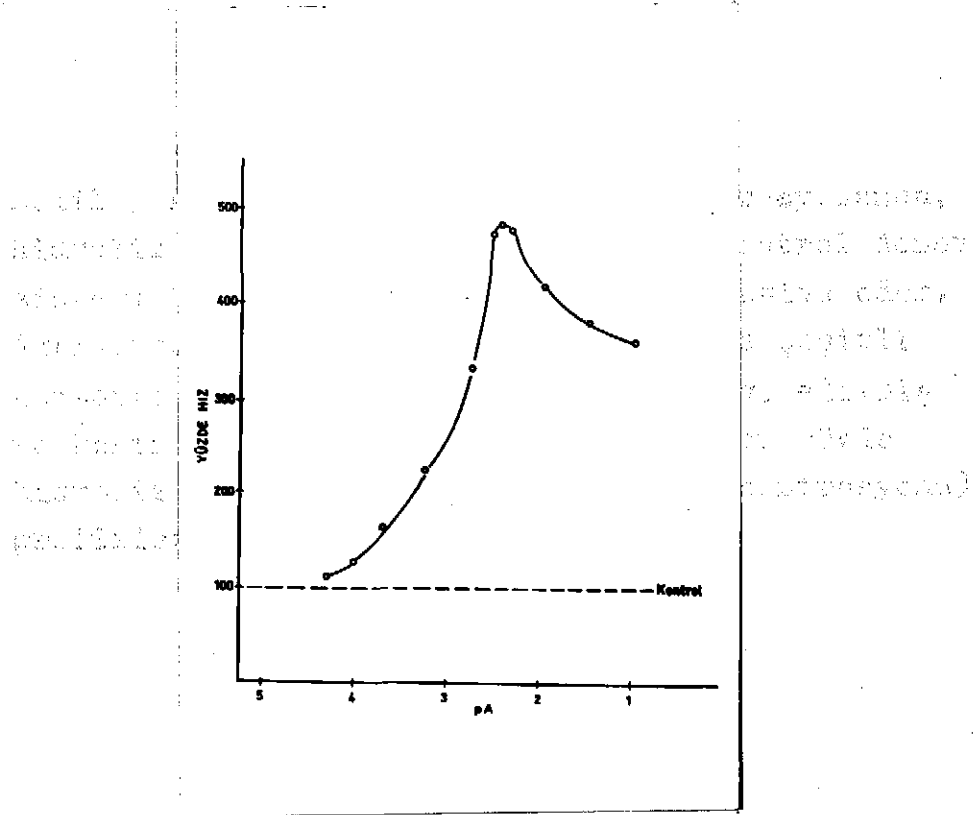
Inhibitör Anyonlar:

Fluorür ve bazı α -Hydroxy Carboxylate'lar enzimin inhibitörleridir. (Şekil 3 B) de Fluorür ve lactate'in tesiri grafik olarak gösterilmiştir. Bu grup birleşiklerin enzime bağlanması ile ilgili özgül bir sabite elde edilemedi. Kinetik parametreler (Tablo II) de bulunan eşitliklerden 11. ve 12. kademelerin ihmal edilmesi ile hesaplandı. Bu tip anyonlar modifiye enzimin maksimal hızında büyük bir azalmaya sebep olurlar.

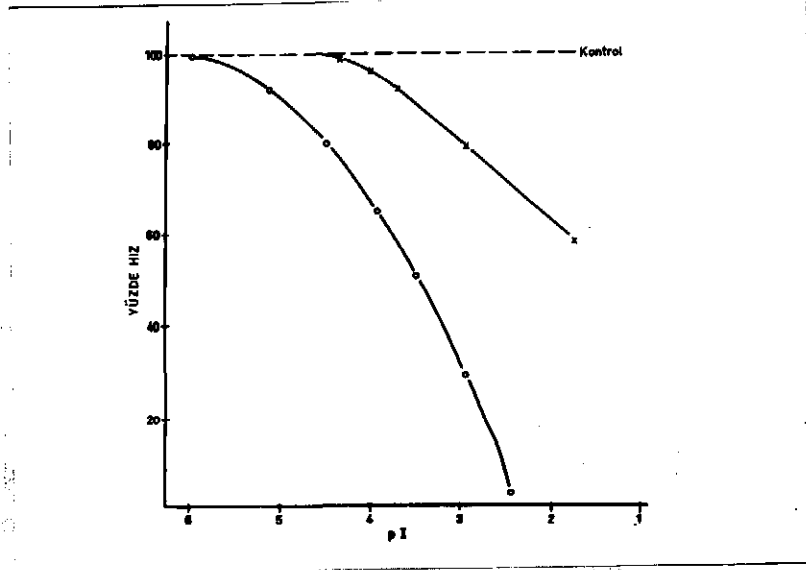
Şekil 3. Çeşitli anyonik aktivatör (Formate) konsantrasyonlarında enzim hızı yüzdesi. Ordinatta hız (en fazla gözlenen hız yüz kabul edilerek) yüzde olarak bildirilmiştir. Absiste ise Formate konsantrasyonunun negatif logaritması işaretlenmiştir.



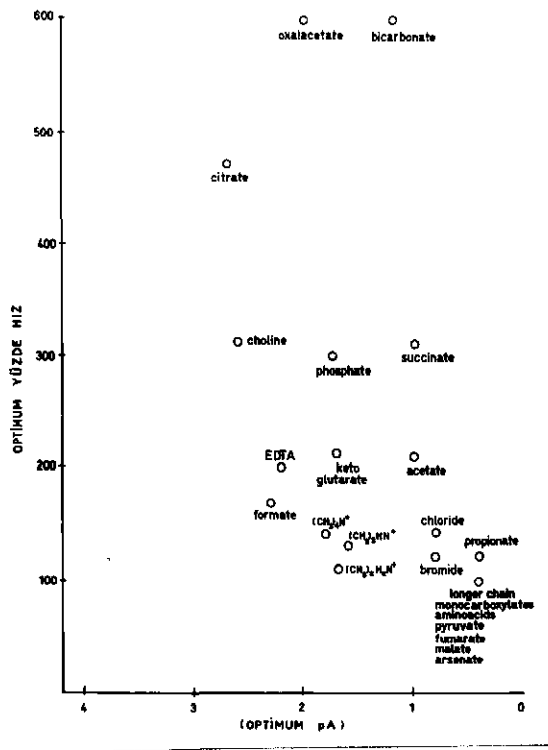
Şekil 3 A. Anyonik aktivatör konsantrasyonunun, hidroliz hızına göre grafiklenmesi: Kontrol deney sistemi 2.5×10^{-5} M. BTC butyrate ihtiva eder. Aktivatörle yapılan deneylerde, ortama çeşitli konsantrasyonlarda sodium citrate ilâve edilmiş ve kontrol deneyi yardımıyla hesaplanan yüzde hidroliz ile pA (- log aktivatör konsantrasyonu) grafiklenmiştir.



Şekil 3 B. Anyonik inhibitör konsantrasyonunun hidroliz hızına karşı grafiklenmesi. Kontrol deney sistemi 2.5×10^{-5} M. BTC Butyrate ihtiva eder. İnhibitörle yapılan deneylerde ortama çeşitli konsantrasyonlarda inhibitör ilâve edilmiştir: (Δ) Fluorür (x) Lactate. Kontrol deneyi yardımıyla hesaplanan yüzde hidroliz ile pI ($-\log$ inhibitör konsantrasyonu) grafiklenmiştir.



Şekil 4. Bazı önemli iyonlarla aktivasyon: Kontrol deney sistemi 2.5×10^{-5} M. BTC Butyrate ihtiva eder. Kontrol deneyinden yüzde hidroliz olarak hesaplanan optimum aktivasyon derecesi, optimum aktivasyonu veren pA'ya (-log aktivatör konsantrasyonu) karşı grafiklenmiştir.



ISININ KATALİTİK AKTİVİTE ÜZERİNE ETKİSİ:

Şekil 5'de çeşitli "modifier" ların bulunduğu bir ortamda enzimin 45°C da ısıtılması ile elde edilen deney neticeleri gösterilmektedir. Ortama aktive edici konsantrasyonda choline veya citrate ilâve edildiğinde enzimin "native" şeklini muhafaza ettiği, buna karşılık fluorür veya inhibe edici konsantrasyonda RO-2-0863 ilâve edildiğinde enzimin tamamen inaktive edildiği görüldü. Enzim "modifier" ların bulunduğu bir ortamda ısıtıldığında hiçbir zaman "desensitize" edilemedi. Bu bulgu yukarıdaki deney şartlarında, enzim konformasyonunda ısıya lâbil veya stabil bir değişikliğin meydana geldiğini gösterir.

Enzim "modifier" sız bir ortamda pH= 5,9'da deionize su veya sodium butyrate ile 45°C 'da 20 saat ısıtılarak "desensitize" edilebildi. Bu durumda enzim aktivitesinin 8 defa azaldığı bulundu (Şekil 5); (Şekil 6).

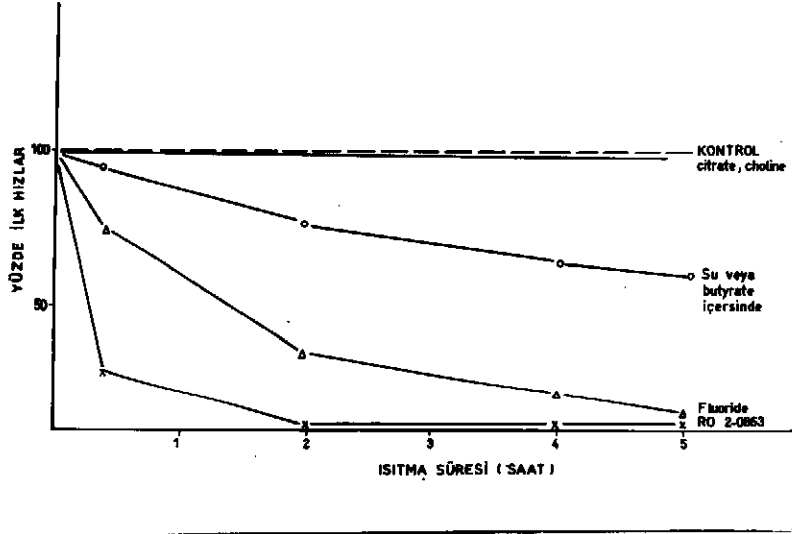
Beklenildiği gibi, citrate veya choline aktivasyonunun ısıtılmış enzim numunelerinde tedricen azaldığı ve enzimin 45°C da 20 saat ısıtılması ile tamamen yok olduğu gözlemlendi (Şekil 6).

Dibucaine RO2-0863 veya yüksek konsantrasyonda choline ilâve edildiğinde, bu birleşikler "desensitize" enzimi "competitive" olarak inhibe ettiler.

"Desensitize" enzimin Lineweaver-Burke grafiği (Şekil 7) de çizilmiştir. Bu da "desensitize" enzimin açıkça Michaelis-Menten kinetiklerine uyduğunu gösterir.

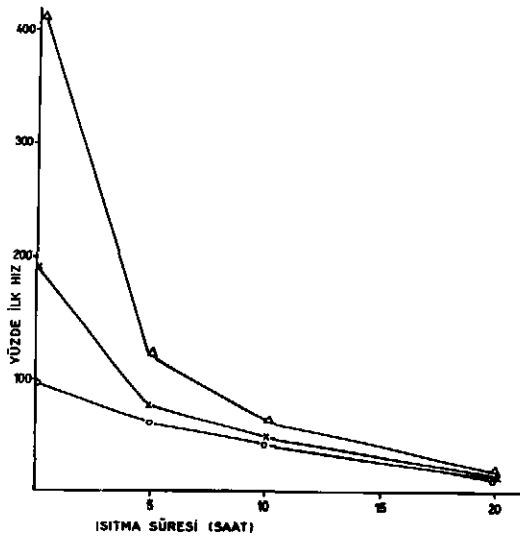
Enzim sübstrat veya aktivatörleri ile inkübe edildiğinde tekrar "resensitize" edilememiş ve tripsin veya hyaluranidase ile inkübasyon enzimin desensitizasyonuna yol açamamıştır.

Şekil 5. Isının enzim aktivitesi üzerine etkisi. 1 mg/ml protein konsantrasyonunda enzim 45°C da, 5 saat süre ile su veya pH=5,9 10^{-3} M sodium butyrate içinde ısıtılmıştır. "Modifier" ilâve edilen deneylerde, "modifier" konsantrasyonları: sodium citrate $3,3 \times 10^{-3}$ M; choline butyrate $3,3 \cdot 10^{-3}$ M; $3,3 \cdot 10^{-3}$ M; potassium fluorur 2×10^{-4} M; RO 2-0863 10^{-8} M. Isıtma süresince tüplerden alınan numuneler maximum aktivasyon şartlarında: pH=8'de ve optimum potassium phosphate ihtiva eden bir ortamda, 10^{-4} M. BTC ile aktivite bakımından test edilmişlerdir.



Şekil 6. Isının choline ve citrate aktivasyonu üzerine etkisi: 1 mg/ml protein konsantrasyonunda enzim 45°C de pH=5,9 , 10^{-3} M. sodium butyrate içinde ısıtılmıştır. Isıtma süresince tüplerden alınan numuneler aktivite bakımından test edilmişlerdir.

- (o) Ortamda süstrattan başka "modifier" yoktur.
- (x) Ortam süstrata ilâveten $3,3 \times 10^{-3}$ M. choline butyrate ihtiva eder.
- (A) Ortam süstrata ilâveten $3,3 \times 10^{-3}$ M. sodium citrate ihtiva eder.



- (e) Ortam süstrata ilâveten $3,3 \times 10^{-3}$ M. sodium citrate ihtiva eder.

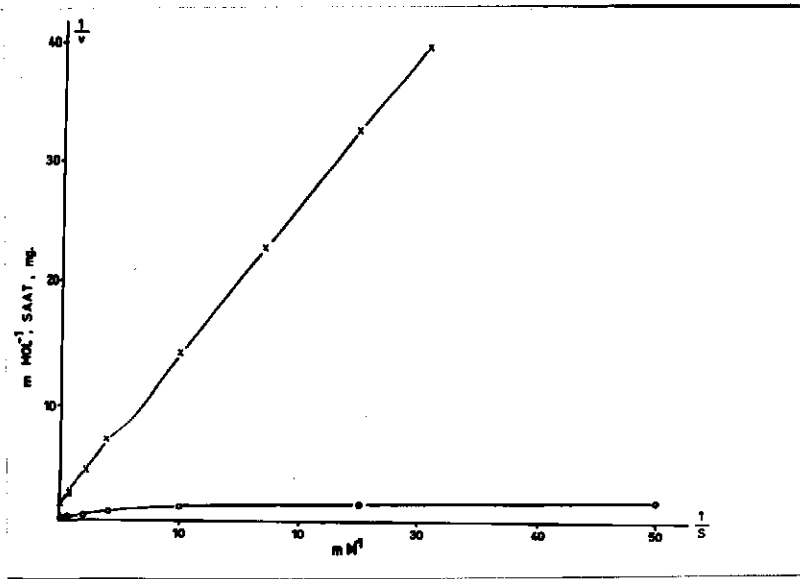
Şekil 7. "Desensitize" enzimin kinetik karakterleri. Enzim preparatı (su içersinde 1 mg/ml protein konsantrasyonunda) 45°C da 20 saat ısıtıldı. Citrate tarafından aktive edilemediği gözlemlendiğinde, soğutulurak pH= 5,9'da ve 30°C'da BTC butyrate hidrolizinin kinetikleri tesbit edildi.

Neticeler Lineweaver-Burke grafiği olarak verilmiştir.

(o) "Native" enzimi

(x) "Desensitize" enzimi (Km=2 mM; Vm=1,3 mM/saat/mgr. enzim)

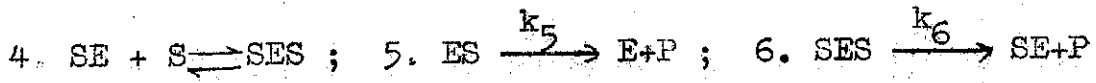
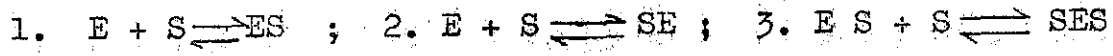
gösterir.



Tablo I

SÜBSTRATE HIDROLİZİ İLE İLGİLİ ÇEŞİTLİ KİNETİK PARAMETRELER

K_1, K_2 vs. tekabül eden denge durumları için mikroskopik dis-sosiasyon sabitlerini gösterir ().



$$K_1 K_3 = K_2 K_4 \quad ; \quad b = (1 + K_1/K_2)^{-1}$$

$$v_o = \left[k_5 e_o b (1 + k_6 s / k_5 K_3) \right] / (1 + K_1 b / s b / K_3)$$

Kinetik sabitler	Süstratlar	
	BTC Butyrate	EC Butyrate
K_1 (M)	10^{-5}	10^{-6}
K_2 (M)	$2,3 \times 10^{-5}$	5×10^{-7}
K_3 (M)	$8,6 \times 10^{-4}$	7×10^{-4}
K_4 (M)	$3,7 \times 10^{-4}$	$1,4 \times 10^{-3}$
b	0,7	0,06
$k_5 e_o$ †	0,7	1,2
$k_6 e_o$ †	7,65	25,0

† Mol / saat / gram enzim

TABLO II.

BAZI ÖNEMLİ MODİFİYERLERLA İLGİLİ, ÇEŞİTLİ KİNETİK PARAMETRELER

Aşağıdaki yeni denge durumları () için de; K sabitleri mikroskopik denge sabitlerini gösterir:



$$V_o = \frac{k_5 e_0 s / K_1 + k_6 e_0 s^2 / K_1 K_3 + k_{10} e_0 s m / K_7 K_9}{[1 + s / b K_1 + s^2 / K_1 K_3 + m s (1 / K_2 K_{11} + 1 / K_7 K_9) + (m / K_7)] (1 + 1 / m K_{12})}$$

$K_{18} = K_7 K_9$

Modifiyerler

Kinetik Sabitler	Kuarterner Azot Birleşikleri			Mühim Anyonlar		
	RO 2-0863 ^x	Dibucaine ^{xx}	Choline ^x	Fluorur	Chlorur	Citrate
K_7 (M)	2×10^{-13}	5×10^{-8}	2.5×10^{-5}	Çok büyük ⁺⁺	Çok büyük	1.5×10^{-4}
K_8 (M)	2.5×10^{-12}	5×10^{-9}	3.3×10^{-4}	"	"	2.5×10^{-3}
K_9 (M)	1.2×10^{-4}	9×10^{-6}	1.3×10^{-4}	7×10^{-8}	10^{-3}	1.7×10^{-4}
K_{11} (M)	1.5×10^{-13}	1.5×10^{-9}	10^{-4}	Sonsuz	Sonsuz	Çok büyük
K_{12} (M)	Çok büyük	Çok büyük	4×10^{-3}	"	"	"
$k_{10} e_0$ +	9.0	100	15	0.01	12.5	12.5

x Sübstrat olarak BTC Butyrate kullanıldı.

xx Sübstrat olarak BC Butyrate kullanıldı.

+ Hidroliz olan mol/saat/gram enzim

++ (Çok büyük) terimi 10^{-2} M. un üzerindeki değerleri gösterir.

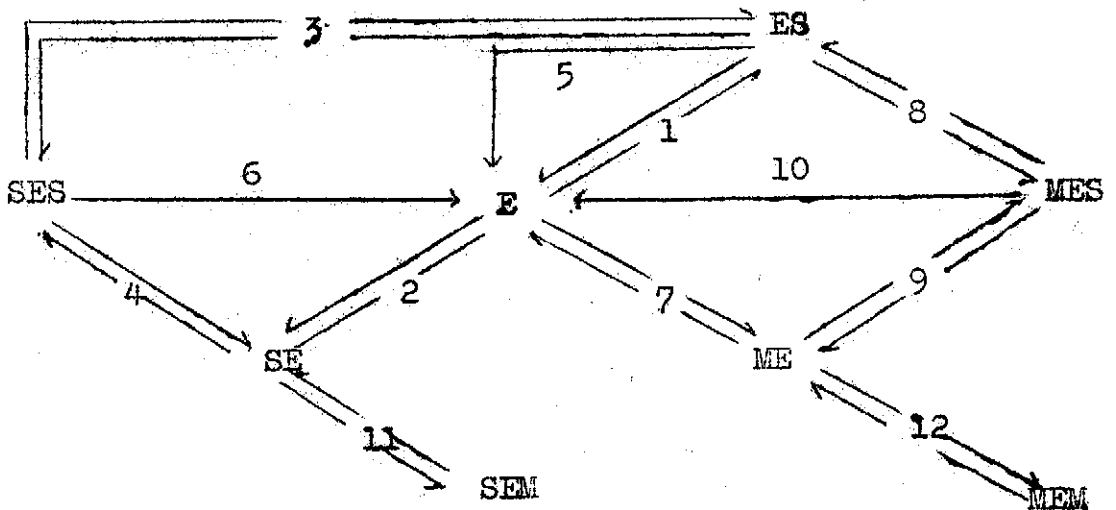
SÜBSTRAT HIDROLİZİ ve MODIFIER'LARLA İLGİLİ KINETİK PARAMETRELERİN, GRAFİK METODLARLA HESAPLANMASI

Süstrat ve "modifier"ların kinetik davranışlarına uygun kinetik eşitlikler, Frieden ve Ogston^(11,13) tarafından çıkarılmıştır. Bununla beraber şimdiye kadar, grafikte çözüm için teklif edilen, detaylı bir yol yoktu.

Tecrübe neticelerinden gerçek kinetik parametrelerin hesabı, kinetik eşitlikleri kullanmak suretiyle, regresyon analizi ve computer çalışmaları ile yapılabilir. Bazı parametreler ise, tecrübe şartlarının özel limit durumlarında, grafik metodlarla hesaplanır.

Tezin bu kısmında: kinetik eşitliklerin basit yaklaşıklıklarla analizi, (Tablo I) ve (Tablo II) de verilen kinetik parametrelerin, grafik metodlarla hesaplanması takdim edilecektir.

Bir "allosteric" enzimin fonksiyonunu temsil eden başlıca eşitlikler aşağıda gösterildiği şekilde şematize edilir (Şema II):



S = substrate
E = Enzim
M = Modifier

Şema II.

Kataliz hadisesinin tamamı, 9 tanesi reversibl olan 12 eşitlikle izah edilebilir. Herbir kademe için mikroskobik dissosiasyon sabiti $K_n = k^{-n}/k+n$ dir. 5, 6, 10 olarak numaralanmış üç irreversible kademe (k sabitlerine bağlı olarak) tekabül eden komplekslerin ürüne dönüşmesini temsil eder.

Büyük bir grup "allosteric" enzim için sübstratın bağlanabileceği en az iki yerin bulunduğu tesbit edilmiş ve (Şema II) bu gözleme dayanılarak hazırlanmıştır.

Eğer "modifier" ile sübstrat arasında, yapı bakımından benzerlik varsa, "modifier" sübstratın bağlanma mahallerinden birine, aksi halde spesifik "modifier" bağlanma mahalline bağlanır. Bu durum (Şema III) de gösterilmiştir. Umumiyetle 5, 6 ve 10 numaralı reaksiyonlar için hızlar farklıdır. Buna bağlı olarak: sübstrat aktivasyonu, "modifier" aktivasyonu veya "modifier" inhibisyonu gözlenir.

"Allosteric" enzimlerin katalizini, halen bilinen özelliklerine dayanarak, en uygun ve en tatminkâr şekilde (Şema II) temsil eder.

Frieden ve Ogston tarafından bu kataliz şemasına uygun olarak çıkartılan kinetik eşitlik şöyledir:

(Eşitlik 1):

$$v = \frac{k_5 e_0 s / K_1 + k_6 e_0 s^2 / K_1 K_3 + k_{10} e_0 s m / K_7 K_9}{1 + s / b K_1 + s^2 / K_1 K_3 + m s (1 / K_2 K_{11} + 1 / K_7 K_9) + m / K_7 (1 + 1 / m K_{12})}$$

Bu eşitlikte:

$$K_7 K_9 = K_1 K_8 ; K_1 K_3 = K_2 K_4 \text{ ve } b = (1 + K_1 / K_2)^{-1} \text{ dir.}$$

k ve K sabitlerinin relative oranına bağlı olarak formüle uygun, birden fazla eğri vardır.

Eşitliğin analizini basitleştirmek için, eşitlik bazı limit şartlarla tahdit edilir:

1. Süstrate ortamda mevcut tek "modifier" ise, bütün m terimleri kalkar. k_5 , k_6 ve K_1 , K_2 , K_3 , K_4 sabitleri hesaplanır.
2. Yukardaki sabitler eşitliğe konularak, "modifier" in enzime bağlanması ve etkisi ile ilgili sabitler hesaplanır.

Süstratın Modifier Olarak Etkisi:

Süstrat ortamda mevcut tek "modifier" ise, (Eşitlik 1) şu şekli alır (Freiden tarafından çıkartılmıştır):

(Eşitlik 2):

$$v_0 = \frac{k_5 e_0 b K_3 s + k_6 e_0 b s^2}{K_1 K_3 b + K_3 s + b s^2}$$

Eşitliğe uyan birden fazla eğri vardır. Bu sebeple bazı yaklaşıklıklar yapılmalıdır.

a) Süstrat aktivasyonu "obligatory" bir aktivasyon ise:

Bu halde ($k_5 e_0$) teriminin çok küçük veya sıfır olduğu farzedilir ($k_6 e_0$; $k_5 e_0$; $b = 1$ buradan K_2 K_1) ve (Eşitlik 2) aşağıdaki basit şekle dönüşür:

(Eşitlik 3):

$$v_0 = \frac{k_6 e_0}{1 + K_3/s + K_1 K_3/s^2}$$

$$k_6 e_0 / v_0 = 1 + K_3/s + K_1 K_3 / s^2 \text{ olur.}$$

Parametreler, bu konkav eğrinin (s) in limit değerlerinde analizi ile hesaplanır (Şekil 8). Küçük (s) konsantrasyonlarında $K_1 K_3/s^2$ terimi, büyük (s) konsantrasyonlarında ise K_3/s terimi ihmal edilir ve Lineweaver-Burke grafiği basit $y=ax+b$

şekline dönüşür. Burada $x = \frac{1}{s^2}$ veya $x = \frac{1}{s}$ dir. Eğim, ilk hal için $K_1 K_3 / k_6 e_0$, ikinci hal için $K_3 / k_5 e_0$ dir. Her iki halde eğri ordinatı $1/k_6 e_0$ noktasında keser.

b) Sübstrat aktivasyonu "obligatory" olmayan bir aktivasyon ise:

Bu halde eğrinin analizi daha zordur ve $k_6 / k_5 > b$ olarak tarif edilir ($k_6 \approx k_5$ olabilir).

Bir aktif mahalle ve bir de aktive edici mahalle sahip enzimlerden başka, iki aktif mahalle sahip enzimler de aynı kinetik davranışı gösterirler. Sadece kinetik delillerle, bu iki muhtemel hal birbirinden ayırdedilemez.

Böyle bir aktivasyonda genel olarak $k_6 > k_5$ dir. Fakat $K_2 \ll K_1$ olduğunda $k_6 < k_5$ olsa dahi, aktivasyon görülebilir.

$s (1/v_0 - 1/k_6 e_0)$, $1/s$ 'e göre grafiklendiğinde;

$k_5 = 0$ veya çok küçük ve $k_6 > k_5$ ise, linear bir doğru elde edilir. Doğru ordinatı $k_3 / k_6 e_0 b$ noktasında, absisi $-1/K_1 b$ noktasında keser. $K_2 \gg K_1$ olduğunda, K_1 ve K_3 hesaplanabilir. $K_2 \ll K_1$ ise $-1/K_1 b = 1/K_2$ dir.

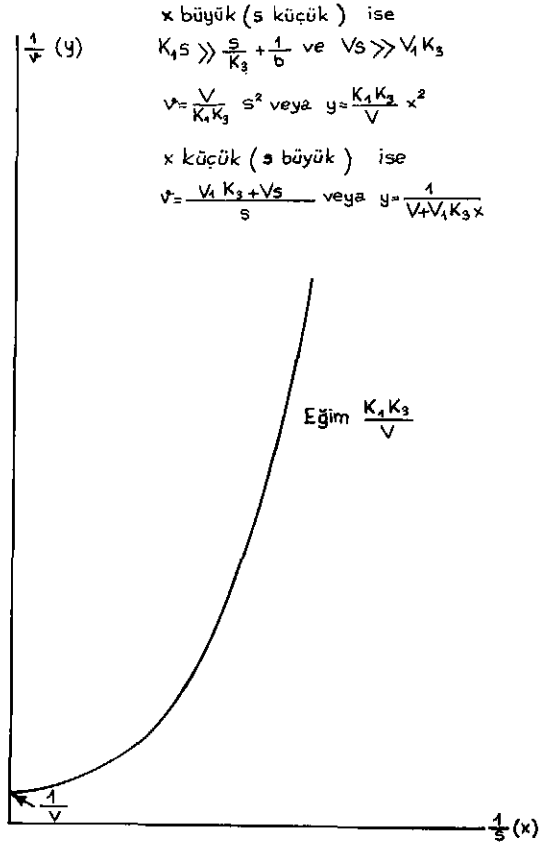
$k_5 > 0$ ve $k_6 < k_5$ olduğu takdirde, yukarı konkav bir eğri elde edilir.

$k_6 / k_5 = b$ veya $K_1 / K_2 < 10$ olduğunda aktivasyon görülmez.

Bütün bu özel haller Frieden tarafından incelenmiştir.

$k_5 > 0$ ve $k_6 > k_5$ ise eğri aşağı konkavdır ve genel olarak "obligatory" olmayan sübstrat aktivasyon eğrisini temsil eder. Eğriye ait parametreler determinant yoluyla çözülebilirse de, fazla zaman kaybına yol açar. (Şekil 9) da bu tip bir aktivasyon eğrisi verilmekte ve parametreleri tayin için yeni bir grafik metod takdim edilmektedir.

Şekil 8. "Obligatory" süstrate aktivasyonunda Lineweaver-Burke eğrisi.



Modifier'ın Etkisi:

Daha evvel, ortamda sübstrat ve "modifier" bulunduğunda, allosterik bir enzimin kataliz mekanizması şematize edilmiş (Şema 2) ve buna uygun kinetik eşitlik verilmişti (Eşitlik 1). Bu eşitlik iki değişken ihtiva eder: sübstrat ve "modifier".

"Modifier" ın enzimatik katalize olan etkisini inceleyebilmek ve ilgili parametreleri hesaplayabilmek için: sübstrat konsantrasyonu sabit tutulur ve deneyler çeşitli "modifier" konsantrasyonlarında tekrarlanır.

a) "Modifier" yapı bakımından sübstrata benziyorsa: bu takdirde düşük konsantrasyonlarında bir "allosteric" aktivatör, yüksek konsantrasyonlarında ise SEM ve MEM (dead-end) komplekslerinin teşekkülü sebebiyle bir inhibitör olarak rol oynar (Şekil 10).

Dikkatli bir çalışma ile kritik m' , m'' konsantrasyonları; yüksek "modifier" konsantrasyonunda $1/v$ ve m arasındaki linear bağıntı ve diğer kinetik parametreler (Şekil 10) da gösterildiği şekilde grafik metoduyla hesaplanabilir.

b) "Modifier" ile sübstrat arasında yapı bakımından benzerlik yoksa: Kinetik parametrelerin hesaplanmasında aşağıdaki eşitlik kullanılır:

(Eşitlik 4):

$$v = \frac{k_5 e_0 s / K_1 + k_6 e_0 s^2 / K_1 K_3 + k_{10} e_0 s m / K_7 K_9}{1 + s/bK_1 + s^2/K_1 K_3 + ms(1/K_7 K_9 + 1/sK_7)}$$

(s) sabit ve $m \gg s$ olduğunda eşitlik:

$$v \cong k_{10} e_0 / (1 + K_9/s) \text{ şeklini alır.}$$

($k_{10} e_0$) teriminin absölu değerine bağılı olarak, "modifier" ın yüksek konsantrasyonlarında, aktivasyon veya inhibisyon gözlenir (Şekil 11) ve hız bir maximum veya bir minimum değer için sabit kalır.

Çeşitli, fakat sabit (s) konsantrasyonlarında, deneyler tekrarlanır ve her (s) konsantrasyonuna tekabül eden maximum ve minimum değerler tesbit edilir (1/v) (max. veya min.) (1/s)e göre grafiklendiğinde K_7 , K_9 ve $k_{10}e_0$ değerleri hesaplanabilir.

c) "Modifier" bir inhibitör olarak rol oynuyorsa:

Yüksek "modifier" konsantrasyonlarında sabit bir (v) değeri elde edilemez ve hız sifıra yaklaşır. Buradan ($k_{10}e_0$) teriminin çok küçük değerler aldığı ve hattâ sifıra yaklaştığı neticesi çıkartılır. Hız eşitliği:

(Eşitlik 5):

$$v = \frac{k_5 e_0 s / K_1 + k_6 e_0 s^2 / K_1 K_3}{1 + s/bK_1 + s^2/K_1 K_3 + ms(1/K_7 K_9 + 1/K_2 K_{11} + 1/s K_7) + 1/K_7 K_{12}}$$

(s) sabit ve $m \gg s$ olduğunda:

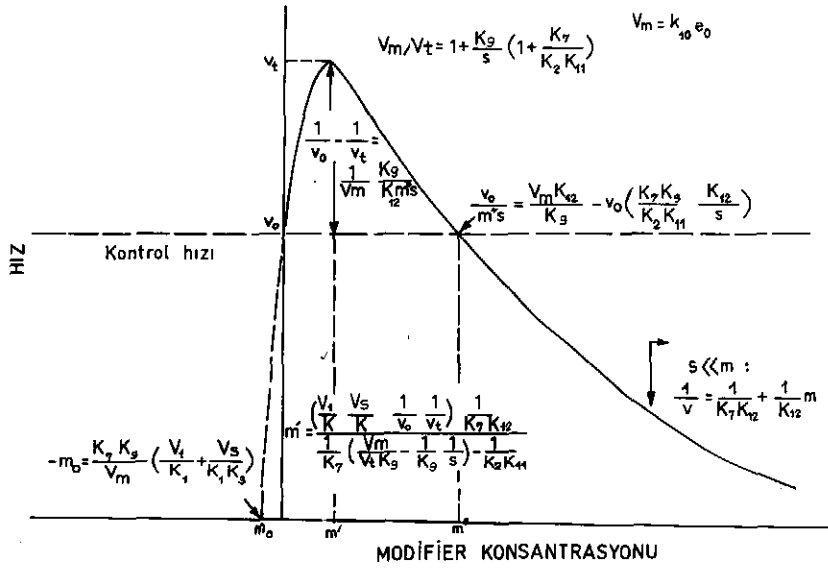
$$(k_5 e_0 s / K_1 + k_6 e_0 s^2 / K_1 K_3)(1/v - 1/v_0) = ms(1/K_7 K_9 + 1/s K_7 + 1/K_2 K_{11}) + 1/K_7 K_{12}$$

şeklini alır.

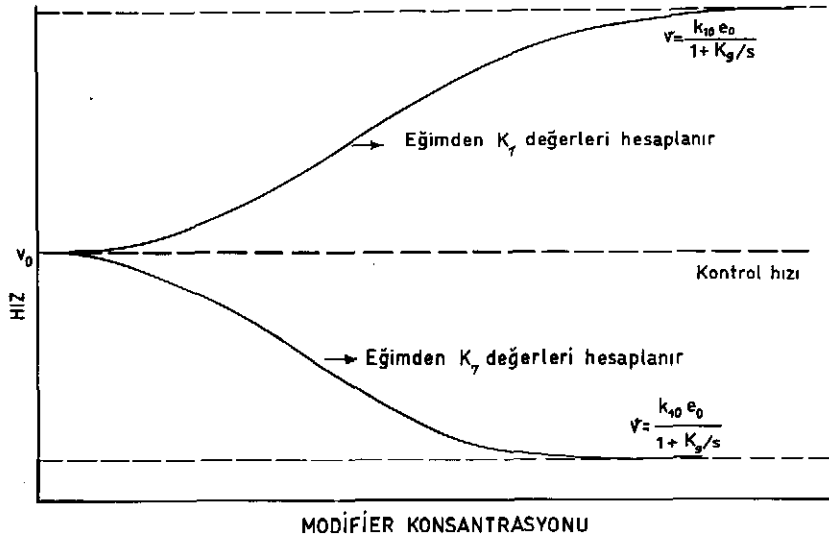
Sabit (s) ve değişen (m) konsantrasyonlarında:

$(k_5 e_0 s / K_1 + k_6 e_0 s^2 / K_1 K_3)(1/v - 1/v_0)$ değerleri (ms) e karşı grafiklenirse, ordinatı $(1/K_7 K_{12})$ noktasında kesen ve eğimi $(1/K_7 K_9 + 1/s K_7 + 1/K_2 K_{11})$ olan bir eğri elde edilir. Deneylerin çeşitli, fakat sabit (s) konsantrasyonlarında tekrarlanması ve aynı şekilde grafiklenmesi ile K_7 , K_{12} hesaplanabilir. Eğer "modifier" ve sübstrat arasında yapı benzerliği yoksa K_{12} ve $K_{11} \infty$ (sonsuz) değere eşit olacağından K_9 'un değeri bulunabilir (Şekil 12).

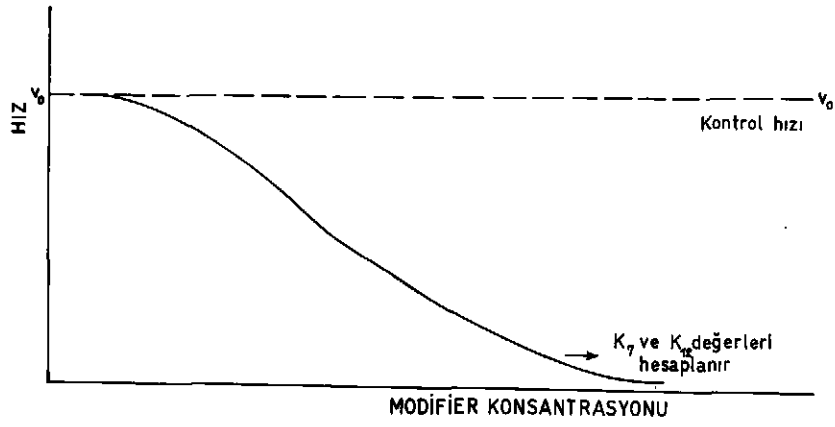
Şekil 10. Yapı bakımından sübstrata benzeyen "modifier" konsantrasyonuna bağlı hız eğrisi ve bununla ilgili parametreleri tayin için teklif edilen yeni bir grafik metod.



Şekil 11. Yapı bakımından süstrata benzemeyen "modifier" konsantrasyonuna bağlı hız eğrisi.



Şekil 12. Bir inhibitör olarak rol oynayan "modifier" konsantrasyonuna bağlı hız eğrisi.



T A R T I S M A

Pseudocholinesterase'in sübstratlarına karşı gösterdiği kinetik davranış ve sübstratları tarafından aktive edilebilmesi, enzimin "allosteric" bir protein olması ile izah edilebilir. Bu izah, enzimin ısı ile desensitizasyonu ve enzim üzerinde bazı "modifier" ların bağlanabileceği ayrı mahallerin tesbiti ile kuvvetlenmiştir.

Bununla beraber cholinesterase'ların⁽¹⁴⁾ ve hattâ pseudocholinesterase'in^(6,14) sübstrat inhibisyonu göstermesi ile ilgili neşriyatlar vardır ve bu inhibisyon aynı aktif mahalde sübstrat moleküllerinin "competitive" inhibisyonu şeklinde tarif edilmiştir.

Bölümümüzde, tezde tarif edilen deney şartlarında $pH \approx 7$ de ve yüksek iyonik kuvvete sahip bir ortamda, aynı enzim preparatının kullanılması ile sübstrat inhibisyonu gözlenmiştir⁽⁹⁾. Bu netice tezde takdim edilen mekanizmayı tekzip etmez, yüksek sübstrat konsantrasyonunda "competitive" sübstrat inhibisyonunun görülmesi beklenen bir neticedir.

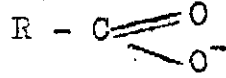
Aynı deney şartlarında yüksek konsantrasyonda "modifier" ihtiva eden ve yüksek pH dolayısıyla HCO_3^- ile kontamine olmuş bir ortamda, düşük sübstrat konsantrasyonunda gözlenen "allosteric" davranışın yok olması beklenir. Bu sebepten de enzim, şimdiye kadar "allosteric" bir protein olarak tarif edilememiştir.

Çeşitli "modifier" larla yapılan deneyler, enzim üzerinde aktif merkez dışında "modifier" ın bağlanabileceği mahallerin bulunduğu delil teşkil eder. Gerçekten de bu birleşiklerin enzim üzerinde ayrı bir mahalle bağlanması sebebiyle, hidroliz daha büyük bir maksimal hızla cereyan eder (sübstrat için: Tablo I'deki k_6e_0 değeri, "modifier" lar için Tablo II'deki

k_{10}^e değeri). Konsantrasyonun artması ise, bu birleşiklerin aktif mahalle bağlanmaları ile "competitive" inhibisyona sebep olur (Şekil 1 B ; Şekil 2).

Cholin dibucaine ve R 02-0863 için tesbit edilen dissosiyasyon sabitleri, sübstrat için aynı anlamda tesbit edilen sabitler kadar veya daha ufaktır (K_7, K_8 Tablo II; K_2, K_3 Tablo I). Bu bulgu da bu birleşiklerin enzim yüzeyine spesifik olarak bağlandığını telkin eder. Ancak bu birleşiklerle veya sübstratla bir defa bağlanmış bir enzim kompleksine, aynı birleşiklerin ikinci bir defa bağlanması (SE ve ME komplekslerine) çok daha büyük K_{11} ve K_{12} (Tablo II) değerlerinin işaret ettiği gibi, daha zor cereyan etmektedir. Takdim edilen kinetik bulgular aktif mahal dışındaki bağlanma alanlarının adet ve kimyasal yapısı hakkında bilgi vermemektedir.

Anyonlarla yapılan çalışmalarda ise, aktivatör grubunun carboxyl gruplu birleşikler için,



şeklinde olması gereği ortaya çıkmış ve aşağıdaki neticeler elde edilmiştir:

a) R grubunun (OH) olması halinde enzim şiddetle aktive edilir, fakat maximum aktiviteye ancak yüksek konsantrasyonlarda erişilir. Buna mukabil R grubunun (H) olması ile (format) çok küçük konsantrasyonlarda dahi iyi bir aktivite elde etmek mümkündür. R'in ($-CH_3$) olması halinde ise daha iyi bir aktivasyon meydana gelir.

Bütün bunlardan allosterik aktivatör mahallinin çok küçük bir mahal olması neticesi çıkar. Zira R'in ethyl propil, butyryl valeril radiksleri, veya dallı alifatik zincirler halinde büyümesi carboxylatın etkisiz olmasına yol açmaktadır.

b) Enzimin iki şekli vardır⁽⁹⁾. Carboxylate'lar bunlardan ancak aktif şekle bağlanabilir. Bu bağlanma mahallinin özelliği: Halojenler ve bütün küçük anyonların içeriye sığabileceği bir büyüklükte olmasıdır. Bu sebeple halojenler ve bütün küçük anyonlar aktivatördürler. Enzimin kinetikleri incelendiğinde, bu grup birleşiklerin birbirlerine additive⁽⁹⁾ olarak etkiledikleri görülmüştür. Halojenler içerisinde en elektrogenatif olan (F) bu konuda tek istisnayı teşkil eder. Zira (F) aynı mahalle enzim inaktif şekildeyken de sığabilir ve enzimi inaktif şekilde tutarak inhibitör etkisi gösterebilir.

c) Eğer yukarıda belirtildiği gibi $R-CH_2-C \begin{smallmatrix} \leq O \\ \backslash \end{smallmatrix}$ grubu molekülde birkaç defa tekrarlanıyorsa aktivatör etkisi fazlaşır. Fakat, tekrarlanan üniteler birbirleri etrafında serbest rotasyon arz ediyorlarsa, (succinate) veya R grubu büyük bir grupsa (α -keto glutarat) etki azalır.

Carboxyl grupları birbirlerine göre trans durumunda iseler enzim üzerine hiçbir etkileri yoktur (Fumarate). Aynı birleşimin cis konfigürasyonunda (Maleat) olan şekli ise enzimi aktivatör olarak etkiler.

Muhtemelen etkinin cis konfigürasyonundaki carboxylate grubunun sayısına göre arttığı söylenebilir.

d) Yan α -süstitüsyonlar (α -Hydroxy, α -keto ve α -Amino carboxylate'lar), yukarıda izah edildiği şekilde carboxylate'ın bağlanma mahalline sığmasına engel olmak suretiyle aktivasyon etkisini azaltırlar.

e) Oxalo acetate cis yapısında olması sebebiyle diğer bütün keto asitlerin aksine kuvvetli bir aktivasyon gösterir.

f) Kalow'a göre enzimin aktivitesi yani V_m , substratın anyonik kısmındaki carboxyl yan zincirinin uzaması ile artar ve K_m azalır. O halde burada bulunan bulgular bu düşünceyle

karşılaştırılırlarsa enzimin üzerinde süstratın anyonik kısma bağlandığı mahal dışında özgül bir aktivatör sahası vardır ve ufak moleküllerin carboxylate, phosphate, halojen vs. nin sığması ile aktivasyon başarılabilir.

g) Genellikle aktivatörlerin etkisi çifttir. Çok yüksek konsantrasyonda inhibitör etkisi gösterirler. Bunun sebebi de çok yüksek konsantrasyonda süstratın parçalandığı anyonik mahalde, aktivatörlerin süstrata rekabet göstermeleridir.

Yapılan çalışmalardan, citrate, oxaloacetate ve bicarbonate'ın düşük konsantrasyonlarında enzimin en kuvvetli aktivatörleri olduğu, yüksek konsantrasyonlarında ise enzimi inhibe ettikleri neticesi çıkartılır.

Citrate aktivasyonu enteresandır. Bu anyonun diğer "Allosteric" enzimlere, phosphofruktokinase'a⁽¹⁵⁾ ve AcetylSCoA Carboxylase'a⁽¹⁶⁾ "modifier" olarak etkilediği rapor edilmiştir. Tez çalışması ile elde edilen ve PCE'nin optimum aktivasyonuna tekabül eden citrate konsantrasyonu, AcetylSCoA carboxylase enzimi için verilen değere aynen uymaktadır.

Yukarıda tartışıldığı gibi, diğer Krebs Siklusu intermedierleri, enzime tesir etmezler veya çok yüksek konsantrasyonlarında aktivasyona sebep olurlar (Şekil 4).

Özellikle citrate için bulunan dissosiasyon sabitlerinin (K_7, K_8 Tablo II) küçük olmasına mukabil, bu sabitler diğer anyonlar için çok büyüktür.

Bicarbonat enzimin en kuvvetli aktivatörüdür. 20-30 mM serum konsantrasyonuna tekabül eden konsantrasyonda enzim aktivitesini 3-4 misli arttırmasına rağmen, özel bir bağlanma sabiti vermez.

Bütün bu bulguların fizyolojik anlamı bilinmemektedir. Bununla beraber citrate'ın aktive edici tesiri ve çeşitli denatüran ajanlara karşı enzimleri koruyucu etkisi, diğer cholinesterase'lar için, purifiye sinir hücresi cholinesterase'ı⁽¹⁷⁾ ve eritrosit cholinesterase'ı⁽¹⁸⁾ için gösterilmiştir.

Fluorür ve lactate'ın etkisi şimdiye kadar tartışılan birleşiklerden çok farklıdır ve sadece inhibisyona sebep olurlar. Lactate'ın etki etmesine mukabil pyruvate'ın etkisiz oluşu, ve gene glycolate ve α -hydroxybutyrate'ın çok az etkide bulunuşu, lactate'ın enzim aktivitesinin tanziminde özel bir rolü olduğunu telkin etmektedir. Ancak bu bulgunun fizyolojik ehemmiyeti açık değildir.

Enzim 45°C'a kadar ısıtıldığında, aktive edici "modifier" konsantrasyonlarında enzimin "native" karakterleri değişmez. Fakat inhibe edici konsantrasyonda "modifier" ilâvesi ile enzim derhal ve irreversibl olarak inaktive olur. "Modifier" ihtiva etmeyen bir ortamda ise enzim "desensitize" edilebilir.

Yukardaki bulgulardan enzim üzerinde spesifik "modifier" bağlanma mahallerinin varlığı ve "modifier" tarafından bağlanan enzimin, moleküler yapısında değişikliklerin meydana geldiği neticesi çıkartılabilir.

Bununla beraber, tezde tartışılan çeşitli birleşiklerin hareket mekanizmasının ve bağlı enzimde meydana gelen yapı değişikliğinin aydınlatılması, ileride yapılacak fiziko-kimyasal çalışmalarla mümkün olabilir.

SÖZLÜK:

Allosteric enzimler: Sübstrat ve ürünleri dışında, sübstrat ve ürünle yapıca benzerlik göstermeyen birleşikler tarafından etkilenen (heterotropic etkiler) ve daima sübstratları tarafından aktive edilen (homotropic etki) enzimlerdir. Bu etkiler aktivatör (cooperative) veya inhibitör (antagonistic) olarak tasnif edilebilir. Sübstrat daima cooperative homotropic etkiye yol açar. Allosteric enzimler biokimyanın gerçek irreversible enzimleridir ve genellikle yer almış oldukları metabolik yolun hızını tayin ederler.

Competitive inhibisyon: Sübstrata yapı bakımından benzeyen moleküllerin, aktif merkezde, sübstrat yerine bağlanarak, ürün vermeyen bir kompleks meydana getirmeleridir.

Cooperative homotropic etki: Sübstratın, allosteric bir enzimin inaktif şekline bağlanması ile, enzimin aktif ve dolayısıyla daha fazla ürün veren şekle dönüşmesidir.

Desensitize enzim: Allosteric bir enzimin ısı veya kimyasal etkenlerle, allosteric özelliğini kaybederek Michaelis-Menten kinetiklerini göstermesidir. Bu arada enzim üzerinde mevcut heterotropic cooperative etkiler kaybolur.

Modifier: Allosteric bir enzime bağlanarak, enzimin yapısında, dolayısıyla aktif merkezin konfigürasyonunda ve enzimin katalitik özelliğinde değişikliklere yol açan; genellikle kimyasal yapısı sübstrat ve üründen farklı, küçük moleküllerdir.

Native enzim: Yapısı ve kinetik karakteri bakımından, fizyolojik in vivo özelliklerini muhafaza eden enzim.

"Obligatory activation": Eğer modifier veya sübstrat tarafından husule getirilen kimyasal değişikliğin sonunda gözlenen hız, bu tip birleşikler mevcut olmadan (veya küçük sübstrat konsantrasyonunda) gözlenen hızdan çok daha büyükse, bu tip aktivasyon "obligatory activation" olarak tanımlanır.

Interaction: Allosteric bir enzimde, sübstrat veya modifier'in aktif merkez dışındaki spesifik mahalle bağlanması ile aktif merkeze sübstratın veya modifier'in bağlanma özelliklerinin değişmesidir.

Resensitize enzim: Allosteric özelliğini kaybetmiş bir enzimin bir modifier, fiziko-kimyasal bir etken veya başka bir etken tarafından allosteric özelliğini tekrar kazanmasıdır.

REFERANSLAR

1. P.T. Özand, N. Renda, F. Tezcan, A.M. Karahasanoğlu ve K. Mergen: Biochim. Biophys. Acta'ya gönderilen makale.
2. S. Callahan, and B.N. La Du, Fed. Proc. 24(1965), 610.
3. H. Harris, D.A. Hopkinson, E. Robson, and M. Whittaker, Ann. Hum. Genet. 26(1963), 359.
4. W. Kalow in Heredity and the Response to Drugs, (London), W.B. Saunders Co., 1962, pp. 69-93.
5. M.R. Swift, and B.N. La Du, Lancet 1(1966), 513.
6. A.M. Karahasanoğlu, and P.T. Özand, J. Lab. Clin. Med. 70(1967), 343.
7. G.L. Ellman, K.D. Courtney, V. Andres, Jr., and R.M. Featherstone, Biochem. Pharmacol. 7(1961), 88.
8. K. Dalziel, J. Biol. Chem., 238(1963), 1538.
9. P.T. Özand, şahsî gözlemleri
10. H. Harris, and E.B. Robson, Biochem. Biophys. Acta 73(1963), 649
11. C. Frieden, J. Biol. Chem., 239(1964), 3522.
12. J. Monod, J.P. Changeux and F. Jacob, J. Mol. Biol. 6(1963), 306.
13. Ogston in The Physical Chemistry of Enzymes, Discussions Faraday Soc., 20(1955), Loc. cit.
14. D. Nachmansohn, and I.B. Wilson, Adv. in Enzym., 12(1951), 259.
15. A. Parmeggiani, and R.H. Bowman, B.E.Res.Commun. 12(1963), 268.
16. P.R. Vagelos, A.W. Alberts, and D.B. Martin, J. Biol. Chem. 238(1963), 533.
17. K. Emerk, Tez çalışması.
18. G. Ciliv, Tez çalışması.