

44816

T.C.  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KOYUN DALAĞINDAN ADENOZİN DEAMİNAZ ENZİMİNİN İZOLASYONU,  
SAFLAŞTIRILMASI, FİZİKOKİMYASAL VE KİNETİK ÖZELLİKLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ  
(A.Ü.Tıp Fak.Biyokimya Anabilim Dalı)

Yük. Kimyager Mustafa KAVUTCU

Danışman, Prof.Dr. İsmail Hakkı GÖKHUN

ANKARA-1995

## İÇİNDEKİLER

## SAYFA

### 1-GİRİŞ VE AMAÇ

### 2-GENEL BİLGİLER

|  |    |
|--|----|
| 2-1. Adenozin deaminazla ilgili çalışmaların tarihi gelişimi | 6  |
| 2-2. Dokulardaki dağılımı ve lokalizasyonu                   | 8  |
| 2-3. Katalizlediği reaksiyonlar ve substrat spesifikliği     | 12 |
| 2-4. İzoenzimleri ve molekül kütleleri                       | 15 |
| 2-5. Adenozin deaminaz'ın optimum pH'sı                      | 17 |
| 2-6. Enzimin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi            | 17 |
| 2-7. Enzimin aktivatörleri ve inhibitörleri                  | 18 |
| 2-8. Adenozin deaminazın klinik önemi                        | 19 |

### 3-MATERYAL VE METOD

#### 3-1. Kullanılan cihaz ve kimyasal maddeler

|                          |    |
|--------------------------|----|
| 3-1-1. Cihazlar          | 21 |
| 3-1-2. Kimyasal maddeler | 22 |

#### 3-2. Metodlar

|   |    |
|---|----|
| 3-2-1. Saflaştırma  | 23 |
| 3-2-1-2. Adenozin deaminaz aktivitesinin tayini                                     | 25 |
| 3-2-1-3. Protein tayini   | 30 |
| 3-2-2. Saflaştırılan enzim'in kinetik özelliklerinin incelenmesi                    |    |
| 3-2-2-1. Değişen adenozin konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisi         | 32 |
| 3-2-2-2. Değişen dimetil glioksim konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisi | 34 |
| 3-2-2-3. Değişen histidin konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisi         | 36 |
| 3-2-2-4. Değişen sistein konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisi          | 38 |
| 3-2-2-5. Değişen kafein konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisi           | 40 |
| 3-2-2-6. Değişen sakkarin ve Mg konsantrasyonunun enzim aktivitesi üzerine etkisi   | 42 |
| 3-2-2-7. Sıcaklık değişikliğinin enzim aktivitesi üzerine etkisi                    | 44 |

#### **4-DENEY SONUÇLARI VE BULGULAR**

##### **4-1. Koyun dalak adenzin deaminaz enziminin saflaştırılmasına ait sonuçlar 45**

##### **4-2. Saflaştırılan enzimin kinetik özelliklerine ait sonuçlar**

4-2-1. Değişen adenzin konsantrasyonunun enzim aktivitesine tesiri 46

4-2-2. Değişen dimetil glioksim konsantrasyonunun enzim aktivitesine tesiri 47

4-2-3. Değişen histidin konsantrasyonunun enzim aktivitesine tesiri 49

4-2-4. Değişen sistein konsantrasyonunun enzim aktivitesine tesiri 51

4-2-5. Değişen kafein konsantrasyonunun enzim aktivitesine tesiri 53

4-2-6. Değişen Na-sakkarin ve Mg konsantrasyonunun enzim aktivitesine tesiri 54

4-2-7. Sıcaklığın enzim aktivitesine tesiri 57

4-2-8. pH değişikliğinin enzim aktivitesine tesiri 57

5- TARTIŞMA 58

6- ÖZET 69

7- SUMMARY 70

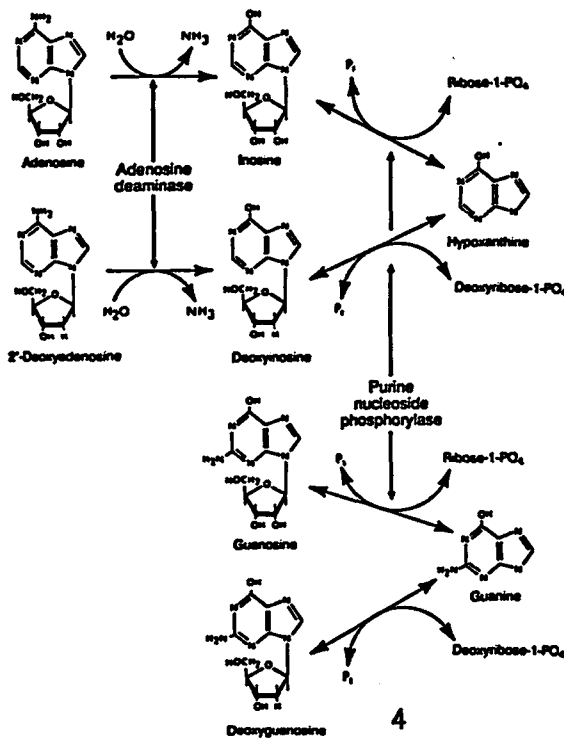
8- KAYNAKLAR 71

**KOYUN DALAĞINDAN ADENOZİN DEAMİNAZ ENZİMİNİN KISMEN  
SAFLAŞTIRILMASI,  
FİZİKOKİMYASAL VE KİNETİK ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**I-GİRİŞ VE AMAÇ**

Günümüzde çeşitli hastalıkların teşhisi,tiplendirilmesi,prognozlarının takibi ve tedavilerinde başvurulmuş parametrelerin başında enzimler gelmektedir.Bu sebeple klinik açıdan bu kadar önem arzeden enzimlerden biri olan Adenozin deaminazı'ı koyun dalağında saflaştırarak fizikokimyasal ve kinetik özelliklerini araştıracağız.

Adenozin deaminaz (ADA) [Adenozin aminohidrolaz; EC 3.5.4.4] pürin katabolizmasında görev alan anahtar enzimlerden biridir.Enzim adenozin ve deoksi adenozinden tek yönlü(irreversible) olarak amonyağın ayrılıp sırasıyla inozin ve deoksi inozin oluşması reaksiyonlarını katalizler(1,2,3,4,12,13,22,23,26,43,44) .



Ayrıca adenzinden ürik aside kadar olan reaksiyonda ara ürün olarak açığa çıkan hipoksantin salvage ara yola substrat olarak girdiği için ADA aynı zamanda pürin salvage ara yolu enzimi olarak da kabul edilir (6,7,8,9,10,11,17,18,19,20,21,24,25). Hücrelerde genetik bilgi DNA molekülleri aracılığıyla taşınır. DNA ise pürin ve pirimidin nükleotidlerinden yapılmış polimerik bir makro moleküldür. DNA da bulunan genetik bilgi aracılığıyla RNA sentezi ve dolayısıyla bütün hücre proteinlerinin biyosentezi gerçekleştirilir. Bilindiği gibi kanser hücrelerinde DNA turn-overi ve buna bağlı olarak da nükleotidlerin salvage arayolu normal hücreye göre çok hızlanmıştır. Bu olay kanser hücresinin ihtiyaç duyduğu pürin nükleotidlerinin artışı ile birlikte dir. Kanserli hücrelerde metabolik yolda görev alan enzimlerin aktivitelerindeki değişmeler kanser hücresinin enzimatik profilini yansıtması açısından önemlidir. (78, 79). Ayrıca ADA aktivitesinin immün sistem hastalıkları, hepatit, pankreatit, hemolitik anemi gibi değişik hastalıklarda arttığı veya azaldığına ait çok çalışma mevcuttur (15,18,27,28,29,34,36).

Bu yoldan hareketle biz enzim aktivitelerinin tayinin yanısıra enzimlerin kinetik özelliklerinin tesbitinin metabolizma hakkında daha sağlıklı bilgiler vereceğini düşünmekteyiz. Ayrıca bazı efektörlerin invitro olarak enzimin kinetik özelliklerinde ne gibi bir değişiklikler meydana getireceğinin araştırılmasının biyokimyasal açıdan çok faydalı olacağına da inanmaktayız. Bu maksatla koyun dalağında ADA'ı saflaştırarak farklı efektörlere

karşı kinetik davranışını incelemeyi hedefledik.Bu düşünmeden yola çıkarak kanserli hastaların doku veya serumlarından ADA saflaştırılarak enzimin kinetik özelliklerinin araştırılmasının hastalıkların biyokimyasal yönünün moleküler düzeyde anlaşılmasına katkıda bulunacağına inanıyoruz..Bu tür bir çalışmanın bu amaca yönelik diğer çalışmalara ışık tutacağı kanaatindeyiz.

## 2-GENEL BİLGİLER

2-1.Adenozin deaminazla ilgili çalışmaların tarihi gelişimi.

Adenozin deaminazla ilk ayrıntılı çalışma Convay & Cook tarafından 1939 yılında rat dokusunda yapılmıştır.Bunlar enzimin intestinde yüksek konsantrasyonda bulunduğunu ve kuvetli bir vazodepresant olan adenozinin ona göre rölatif olarak inaktif olan inozine çevrilmesinde ve diğer dokularda varlığında biyosentetik reaksiyonlarda nötralizasyon için amonyak kaynağı olarak etkili olduğunu ortaya koymuşlardır(45).

1952 yılında Clarke ve arkadaşları rat,fare ve kedi gibi hayvanların dokularındaki deaminazların miktarını birbirleriyle karşılaştırmalı olarak çalışarak adenozine yüksek sensitive gösteren reseptörlerle assosiyasyonda defans mekanizması gibi bir rolünün olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

1962'de Purzyeka rat dokusundaki dağılımını Makarewicz & Zydowo vertebraların boşaltım organlarında

amonyak üreten enzimlerin bir kısmını 15 vertebranın böbreğinde çalışmışlardır.

Bunun gibi daha birçok araştırmacı gerek tek dokuda gerekse ADA'nın intraselüler dağılımını keşfetmek maksadıyla (Stern ve ark.1952; Jordan ve ark.1959), Block & Johnson 1954 ise diğer pürin metabolize eden enzimlerle ilişkilerini, Solomon 1960; Fisher ve ark.1962 de büyüme süresince değişimini araştırmışlardır(45).

T.G.Brady ise ADA aktivitesini rat, guinea-pig, fare, kedi, tavşan, köpek ve bazı sığır dokularında çalışarak optimum pH'sını, izoelektrik noktasını ve bazı elektroforetik davranışlarını incelemişlerdir. Ayrıca dokulara göre ADA aktivitesini yüksek ve düşük aktiviteli olarak sınıflandırmışlardır.(45).

Daha sonra N.Pfrogner dana dalağında ADA'ı izoelektrik presipitasyon, amonyum sülfat fraksiyonasyonu ve değişik dolgu maddeleri kullanarak pürifiye etmiştir (46).

Pang F.Ma ve J.R.Fisher 1967-68'li yıllarda değişik hayvanların farklı organ ve dokularından ADA'ı saflaştırarak substrat spesifitesi,  $V_m$ ,  $K_m$ , değişik izoenzimlerinin varlığını keşfederek molekül ağırlıkları, izoelektrik noktaları v.s. gibi fizikokimyasal ve kinetik özelliklerini tesbit etmişlerdir(47, 48, 49, 50).

P.M.Murphy ve arkadaşları da 1969 yılında yaptıkları çalışma ile sığır mukozasından iyon değiştirme kromatografisi ile ADA'ı saflaştırarak değişik substratları deneyerek onlara ait hız ve  $K_m$  değerlerini;

değişik efektörlere karşı (üre, sıcaklık, p-merküribenzoat) izoenzimlerinin davranışlarını incelemişlerdir (52,53).

1970'li yıllara gelindiğinde ise enzim hakkında daha ayrıntılı bilgiler elde edilmiştir. Tabiki bunda gelişen teknolojinin payı tartışılmazdır. J. Phelan ve ark.'ı dana intestinal mukozasından saflaştırdıkları enzimin değişik kimyasal maddelere karşı davranışı ve molekül ağırlıkları yanısıra aminoasit dizisini de tayin etmişlerdir (54,55).

Daha sonraları (1971'li yıllardan sonra) enzimle ilgili çalışmalar çok sayıda artarak değişik bitkiler ve mantarlarda, besin maddelerinde (yumurta akı) tayin edilerek ileri derecelerde saflaştırılmış ve enzimin reaksiyon mekanizması açıklanmıştır (31,41,42,43,51,55,56).

## **2-2. Adenozin deaminazın doku dağılımı ve lokalizasyonu**

ADA memelilerin dokularında bulunmakla beraber doku dağılımları farklıdır (16,22,23,24). T.G. Brady 6 değişik hayvanın farklı organ ve dokularında enzim aktivitesini tayin ederek hayvanlara ve dokulara göre dağılımını tayin etmiştir. Genel olarak çalıştığı bütün hayvanların mukoza ve dalaklarında aktivitenin yüksek olduğunu daha önceki çalışmalarla kıyaslayarak tesbit etmiştir (45). Aynı şekilde değişik organ ve dokularda ADA aktivitesini Ma & Fisher ve Zielke & Suelter de tayin etmişlerdir (47,48,88). Martin B. ve ark.'ı insan dokusunda yaptıkları çalışma sonucu ADA'nın dokulara göre dağılımını şu şekilde sıralamaktadırlar (14):



Tablo 1:İnsan dokusundaki ADA dağılımı

| Doku                 | Spesifik aktivite<br>(nmol/dak/mg.prot.) | Toplam aktivitenin %'si |           |       |
|----------------------|--|-------------------------|-----------|-------|
|                      |  | Large                   | Intermed. | Small |
| Dalak                | 128                                      | 10                      | 2         | 86    |
| Duodenum             | 127                                      | 9                       | 0.7       | 89    |
| Mide                 | 89                                       | 2                       | 0.3       | 96    |
| Jejunum              | 63                                       |                         |           |       |
| Pankreas             | 27                                       |                         |           |       |
| Beyin(Cerebrum)      | 27                                       |                         |           |       |
| Adrenal gland        | 21                                       |                         |           |       |
| Lenf nodu            | 23                                       |                         |           |       |
| Appendix             | 20                                       | 8                       | 2         | 87    |
| Testisler            | 13                                       |                         |           |       |
| Kalp kası            | 11                                       |                         |           |       |
| Karaciğer            | 9  | 59                      | 12        | 24    |
| Beyincik(cerebellum) | 9  |                         |           |       |
| Spinal Cord          | 9  |                         |           |       |
| İskelet kası         | 8  |                         |           |       |
| Akciğer              | 7  | 74                      |           |       |
| Böbrek               | 6  | 86                      |           |       |
| Tiroid               | 4  |                         |           |       |

J.E.Seegmiller de yaptığı çalışmalar neticesinde insan dokularındaki ADA aktivitesini aşağıdaki şekilde vermektedir (15).

| <u>Doku</u>             | <u>ADA aktivitesi (nmol/dak/mg.protein)</u> |
|-------------------------|---|
| Timus                   | 282.8                                       |
| Dalak                   | 12.4  |
| Beyin                   | 5.0   |
| Böbrek                  | 1.8   |
| Karaciğer               | 1.1   |
| Akciğer                 | 0.8   |
| Small intestin          | 14.2  |
| Kalp                    | 2.1   |
| Periferel lenfositler   | 20.7  |
| Periferel granülositler | 11.9  |

R.C.Jackson ve ark.'ı da sıçan dokusundaki ADA aktivitesini şu şekilde sıralamaktadırlar(23):

| Organ veya doku         | ( mg/g. yaş doku) | ADA aktivitesi (nmol/saat/mg. protein) |
|-------------------------|-------------------|--|
| Karaciğer               | 93±3              | 1,510 (100)*                           |
| Böbrek korteksi         | 74±4              | 6,410 (424)                            |
| Kalp                    | 58±4              | 3,870 (256)                            |
| Testis                  | 47±9              | 3,880 (357)                            |
| Dalak                   | 71±6              | 13,900 (923)                           |
| Akciğer                 | 79±5              | 10,900 (719)                           |
| Epididimis yağ tabakası | 18±3              | 2,270 (150)                            |
| Beyin (serebra)         | 32±2              | 713 (47)                               |
| iskelet kası            |                   |  |
| (gastrocnemus)          | 55±4              | 1,130 (75)                             |
| İnce Bar.(mukoza)       | 58±6              | 41,900 (2,780)                         |
| Timus                   | 53±2              | 47,700 (3,160)                         |
| Kemik iliği (femoral)   | 84±10             | 1,800 (119)                            |
| Eritrosit               | 360±32            | 36 (2.4)                               |
| Periferel Lökosit       | 90±6              | 627 (42)                               |
| Kan plazması            | 63±3              | 21 (1.4)                               |

\*Karaciğer ADA aktivitesinin yüzdesi olarak bulunan değerler.

Bu çalışmalara benzer daha birçok çalışmalar yapılarak ADA'nın doku ve organ dağılımı tesbit edilmiştir (24, 44, 57, 58, 59).

Yukarıdaki literatürlerde verilen bilgilere göre enzim hücrelerin sitoplazmasında ve düşük oranda da nükleusunda bulunmaktadır. J.J Centelles enzimin hücrelerin ekstraselüler kompartımanında bulunduğunu da bildirmektedir. Bunların yanında iskelet kası, deri ve cilt'te aktivitenin hiç olmadığı veya çok az miktarlarda olduğu da bildirilmektedir (16, 19, 24, 25).

Enzimin düşük molekül ağırlıklı formu (40000gr/mol) timus, dalak, mide ve eritrositlerde daha fazladır. Buna karşılık karaciğer, böbrek ve ince bağırsakda enzimin molekül ağırlığı yüksek olan

formu (200000gr/mol) bulunmaktadır. Ayrıca lenfoid de mukoza dokusu kadar ADA aktivitesine sahiptir. (59).

### 2-3. Enzimin katalizlediği reaksiyonlar ve substrat spesifikliği.

ADA'nın katalitik özellikleri detaylı bir şekilde birçok araştırmacı tarafından çalışılmıştır. Çalışmalar neticesi enzimin hidrolitik olarak amino, hidroksilamino, kloro ve metoksil gruplarının pürin ribonükleozitlerinin 6 no'lu atomdan ayrılmasını katalizlemektedir. Farklı araştırmacılar substratların hidroliz hızının ayrılan grubun tabiyatına bağlı olduğunu belirtmektedirler. Bunu adenzinin 2 pozisyonundaki amino grubunun veya pürin ribonükleozitlerinin 6 konumundaki amino grubunun hidroliz hızlarının farklılığına dayanarak yapmışlardır. Bu sonucun 6. pozisyonun elektofilik özelliğiyle ilgili olduğunda bildirmektedirler. (56).

P.F. Ma ve J.R. Fisherde adenzin, deoksiadenzin, cordycepin (3'deoksiadenzin), 6-kloropürin ribozid ve 2,6-diaminopürin ribozid'i deneyerek en iyi sonucu adenzinden elde etmişlerdir {relatif olarak adenzin için  $V = 1$  iken deoksiadenzin için 0.35-0.70 dir} (47).

Adenzin ve deoksiadenzin ADA dan başka enzim sistemleri tarafından da substrat olarak kullanılmaktadır. Adenzini, adenzin kinaz (AK) ve S-adenozil homosistein hidrolaz enzimlerinin de substratıdır. Bu enzimlerin katalizlediği reaksiyonlar sonucu ürün olarak, sırasıyla adenzin monofosfat ve S-adenozil homosistein meydana gelir. Deoksiadenzini ise,

ADA dan başka deoksinükleozit kinazın da substratıdır. Ürün olarak sırasıyla deoksi inozin ve deoksiadenozin monofosfat meydana gelir (15).

Bu enzimlerin kinetik özelliklerinin incelenmesi enzimlerin hücrelerdeki önem ve rollerini açıklamada bir fikir verebilir (16). İlgili reaksiyonları şu şekilde gösterebiliriz.

(S-AHase)

-----> S-Adenzil homosistein ( $K_m = 1\mu M$ )

(AK)

ADENOZİN-----> Adenzin monofosfat ( $K_m = 2\mu M$ )

(ADA)

-----> Inozin ( $K_m = 20-50\mu M$ )

Buradan da açıkça görüleceği üzere adenzine karşı ilgisi en fazla olan S-AHase ve AK dır. Ancak bunların Maksimum hızları ( $V_m$ ) incelendiğinde ADA'ın  $V_m$  değeri daha yüksektir. Bu da ADA'ın adenzini metabolize etme kapasitesinin daha yüksek olduğunu göstermektedir (15,16).

ADA'ın diğer tabii substratı deoksiadenozini de aynı şekilde inceleyecek olursak, bu da iki farklı enzimin substratıdır; ADA ve deoksinükleozid kinaz.

(ADA)

-----> Deoksiinozin ( $K_m = 7\mu M$ .)

DEOKSİADENOZİN----- (dAK)

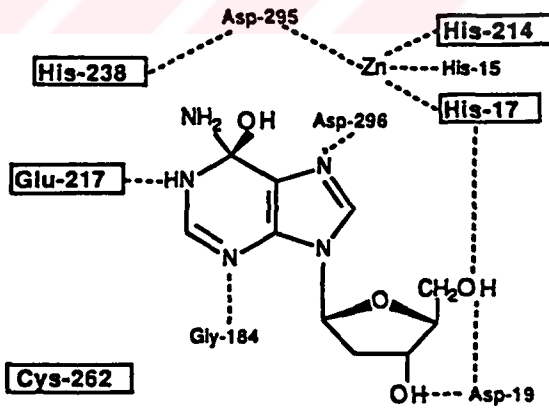
-----> Deoksiadenozin monofosfat ( $K_m = 400\mu M$ .)

Yukarıdaki reaksiyonlar incelendiğinde ADA'ın deoksiadenozine olan affinitesi deoksinükleozit kinazdan

daha fazladır. Ayrıca ADA için bir genelleme yaparsak deoksiadenozine olan ilgi adenozine olandan daha fazladır (15).

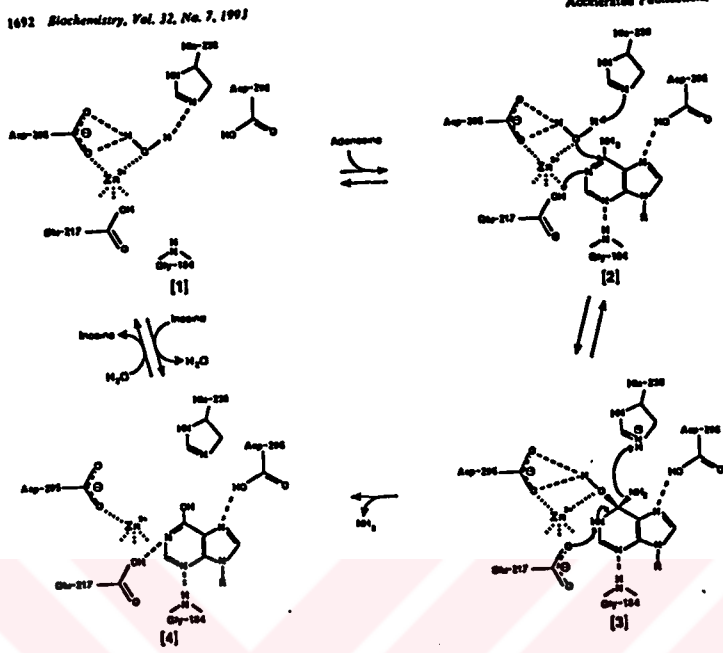
Yapılan çalışmalar sonucu saflaştırılan kaynağa ve organa bağlı olarak ADA'nın  $K_m$  ve  $V_m$  değerleri farklılıklar arz etmektedir. Yaptığımız literatür araştırmaları sonucu ADA'nın ve izoenzimlerinin adenozin substratına karşı  $K_m$  değerinin (0.05-0.1 M pH 7-7.4 fosfat veya Tris/HCl tamponu kullanılarak) 30-400 $\mu$ M arasında değiştiği ifade edilmektedir (14,15,39,40,44,47, 52,55,57).

X-ışınları ile yapılan kimyasal analizler sonucu ADA'nın aktif merkezinde  $Zn^{2+}$  metali ve onunla valans bağı yapmış histidin, glutamik asit ve sistein amino asitlerinin olduğu belirlenmiştir (39,41,42,43). Buna ilişkin şekil aşağıda görülmektedir.



ADA'nın katalizlediği reaksiyonla ilgili etki mekanizma ilk defa 1971 yılında M. Helen Maguire ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Daha sonra konu üzerinde ayrıntılı çalışmalar devam etmiş ve reaksiyonun bir çevrim şeklinde gerçekleştiği anlaşılmıştır. ADA'nın

tesir mekanizması aşağıdaki şekilde görülmektedir(39,41, 42,43,56).



#### 2-4. İzoenzimleri ve molekül kütlesi

ADA'nın izoenzimleri ve molekül kütleleri ile ilgili ilk bilgilerden P.F.Ma ve J.R.Fisher bahsetmektedirler. Araştırmacılar tavuk karaciğerinden saflaştırdıkları enzimin iki ayrı formunun bulunduğunu Sephadex kromatografisi ile tayin etmişlerdir. Bunlardan molekül ağırlığı büyük olanına (110000 mol.wt) "large", küçük olanınada (30000 mol.wt) "small" ADA adını vermişlerdir (47). Aynı araştırmacılar daha sonraki yaptıkları çalışmalarla ADA'nın üç formunun olduğunu tesbit etmişlerdir. Kurbağa dokusundan saflaştırdıkları enzimi A, B ve C şeklinde sınıflandırarak molekül ağırlıklarını sırasıyla 180000, 100000 ve 35000 olarak tesbit etmişlerdir. Bunlardan B formunun karaciğerde C formunun

ise duodenumda baskın olduğunu belirtmektedirler. Bu formlar total ADA aktivitesinin sırasıyla %7,68 ve 25'ini teşkil etmektedirler. Bu çalışmalarına başka canlı ve dokularda devam ederek yaklaşık aynı sonuçları elde etmişlerdir (48,49,50).

P.M.Murphy ve arkadaşları da sığır mukozasında yaptıkları araştırma ile 5 izoenziminin olduğunu bildirmektedirler (52).

J.Phelan ve arkadaşları sığır intestinal mukozasından saflaştırdıkları ADA'nın aminoasit dizisini tayin ettikten sonra molekül kütlelerini sedimentasyon sabiti metoduyla ortalama 34500 olarak hesaplamışlardır(54).

Hıtoshi akedo ve ark.'ları sağlıklı insan akciğeri ve mide dokusundan iki tür ADA olduğunu tesbit etmiş ve bunlara (larger molecular size)  $E_L$  ve (smaller molecular size)  $E_S$  ismini vermiştir. Buna ilave olarak bunların interkonvertible olduğunda belirtmektedir (53).

Martin B.Van der Weyden ve ark.'ı insan dokusunda ADA'nın farklı moleküler formda bulunduğunu ifade ederek bunların birbirlerine dönüşür olduğunu ve molekül ağırlıklarını yaklaşık 36000,114000 ve 298000 (sırasıyla small,intermediate ve large)olarak vermektedirler.

Bunların optimum pH'ları hariç bütün kinetik özelliklerinin aynıdır. pH değerleri: 5.5 intermediate,7.0 large ve 7.4 small formu için. Small form, sadece molekül ağırlığı yaklaşık 200000 olan ve ADA aktivitesi göstermeyen bir protein (binding protein )varlığında large forma dönüşmektedir(14).



ADA'nın doku dağılımı, kinetik özellikleri ve molekül ağırlıkları farklı olan iki izoenzimi mevcuttur. Molekül ağırlığı küçük olan ( $ADA_1$ ) timus, eritrosit ve kalpte mevcutken, serumdaki temel ADA kaynağı  $ADA_2$  dir. Bu iki izoenzimin molekül kütleleri tayin metodlarına göre farklılıklar göstermekle birlikte  $ADA_1$  için 35.000-40.000 ;  $ADA_2$  için ise 110.000-200.000 verilmektedir(10). Ayrıca bu izoenzimler literatürlerde farklı şekillerde de adlandırılmaktadır. Mesela, molekül ağırlığı küçük olan  $ADA_1$  için C veya S, molekül ağırlığı büyük olan  $ADA_2$  için ise A veya L simgeleri kullanılmaktadır (10,12,13). İki molekül  $ADA_1$ 'in memeli dokularında glikoprotein yapısındaki bir proteinle (conversion factor) birleşerek  $ADA_2$  formunu oluşturduğu belirlenmiştir(6,10,12,13,14,33,74).

#### **2-5.Enzimin optimum pH'sı**

Adenozin deaminazla ilgili olarak yapılan çeşitli çalışmalarda enzimin pH aralığı genellikle 5-8 arasında verilmektedir(14,41,44,56,). Buna karşılık bir grup araştırmacı yaptıkları bir çalışmada ADA için pH aralığını 6-11 olarak vermektedir (31).

#### **2-6.Enzim aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi**

Yapılan değişik çalışmalarda ADA enziminin sıcaklığa pek duyarlı olmadığını ancak 65°C'ın üzerinde enzimin aktivitesini kaybetmeye başladığı belirtilmektedir. ADA enziminin 21-52°C arasında sıcaklık artışına paralel olarak aktivitenin de arttığı belirtilmektedir (32,44,52).

## 2-7.Enzimin inhibitörleri ve aktivatörleri

ADA'ın inhibisyonuyla ilgili olarak yapılan bir çok çalışma mevcuttur. Bunlar genellikle pürin nükleozit analogları, civalı organik bileşikler,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Cr}^{3+}$  gibi ağır metallere birlikte +1 yüklü  $\text{Li}$ ,  $\text{Na}$ ,  $\text{K}$ ,  $\text{Rb}$ ,  $\text{Cs}$ ,  $\text{NH}_4$  gibi katyonlar ile  $\text{Mg}$ ,  $\text{Ca}$  ve  $\text{Ba}$  gibi +2 yüklü katyonlar denenmiştir. Bunlardan +1 yüklü katyonların enzimi aktive etmesine rağmen ( $\text{Ag}$  hariç) +2 yüklü katyonların inhibe ettiği belirtilmektedir (31,54). Bunun yanısıra imidazol ve tiol grubuna sahip bileşiklerinde enzimi inhibe ettiği belirtilmektedir (39,44,56). Etanol ve tedavi amacıyla kullanılan bazı sedativ, anxiolitik, analjezik ve relaksant ilaçların da enzimin modülatörleri olduğu belirtilmektedir (44).

Ayrıca hem karaciğer ve hem de hızlı gelişen hepatoma 3924 A da ADA inozin tarafından son ürün inhibisyonuna uğramaktadır (23). J.M. Aran ve arkadaşları tarafından insan eritrositinden afinite kromatografisiyle saflaştırdıkları ADA'ın pürin ribozid tarafından tersinir olarak inhibe edildiğini ve bu inhibisyonun inozinin etkisinden daha fazla olduğunu belirtmektedirler (32). Ayrıca aynı araştırmacılar Erythro-9-(2-hydroxy-3-nonyl)adenin [EHNA] 'in pürin ribozitten daha kuvvetli ADA inhibitörü olduğunu belirtmektedirler (32). J.P.J. Ungerer ve arkadaşlarının insan serumundan elde ettikleri ADA izoenzimlerinden ADA1 ve ADA1+cp nin EHNA tarafından inhibe edilmesine karşılık EHNA'nın ADA2 yi etkilemediğini elektroforetik olarak göstermişlerdir

(33). Aynı sonucu H.Ratech ve arkadaşları da elde etmişlerdir (34). Bunların dışında coformisin, pentostatin ve 2'-kloropentostatin'in de spesifik ADA inhibitörü olduğu belirtilmektedir.

## 2-8.Adenozin deaminazın klinik önemi

Bilindiği gibi ADA adenozinin inozine (veya deoksi adenozinin deoksi inozine) çevrilmesinde görev aldığı için pürin metabolizmasının anahtar enzimlerinden (1,2,3,32,33,39,44,68).Adenozin CNS'de nöromodülatör veya nörohormon olarak kabul edildiği için bu çevrim çok önemlidir,buna karşılık inozinin bu tür bir etkisi yoktur(44).

ADA'nın immünolojik cevabın gelişmesinde ve monositlerin matür makrofajlara dönüşümünde önemli fonksiyonlara sahip olduğu düşünülmektedir(11).

Araştırmacılar direkt olarak tümör hücre sitotoksitesiyle ilişkili bu monositer fonksiyon için ADA'nın gerekli olduğu vurgulanmaktadır(86).Bir ADA inhibitörü olan EHNA ile invitro olarak ADA inhibe edildiğinde monositlerin sitotoksitesinin azaldığı tesbit edilmiştir.ADA'a monositlerin sitotoksik efektör hücreye farklılaşmasında ve gelişmesinde ihtiyaç duyulmaktadır.ADA inhibitörleri ile sitiolitik efektör gelişiminin engellenmesi (monosit kemotaksisi,makrofajların tümör hücrelerine bağlanması) muhtemelen bu reaksiyonlar için esansiyel olan metilasyon reaksiyonlarının engellenmesinden ileri gelmektedir(11).Başka bir çalışmada ADA inhibitörü olarak Ko-formisin ile blok yapıldığında mitojenle stimüle

edilen lenfositlerin proliferasyonunda blok görülmüştür(82).ADA'nın eksikliğiyle ilişkili olarak insanlarda kombine immün sistem bozuklukları gözlenmiştir.Bu tip hastalarda hem humoral hem de hücre sel immünitede defektler ortaya çıkmaktadır(2,13,15,19,21,76,81,83,85).

Ko-formisin,deoksi formisin eritro-9-adenin ile ADA inhibe edildiğinde toksik nükleotid seviyelerinin arttığı ve hücre sel tositeden bu artan toksik nükleotidlerin sorumlu olduğu düşünülmektedir.Artan bu toksik nükleotidler DNA sentezini engellemekte ve sitolize sebep olmaktadır(17,77,79,36).

ADA inhibe edildiği substratları olan adenzin ve deoksi adenzin hücrelerde birikir.Bu iki nükleozitin birikimi ile aşağıda belirtilen olayların meydana gelmesi hücrelerde toksik tesir yapmaktadır(2,15,21,28,69,83,84, 87).

1.Adenzin ve deoksi adenzinden sırasıyla fazla miktarda ATP ve dATP oluşmaktadır.Artan dATP ribonükleotid redüktazı allosterik olarak inhibe etmektedir.Ribonükleotid redüktazın inhibisyonu sonucu deoksinükleotidlerin seviyeleri azalır.Deoksinükleotidler DNA'nın prekürsörleri olduklarından DNA sentezi bozulmakta ve esas olarak lenfositik tositeden bu olay sorumlu tutulmaktadır.

2.Enzimin diğer substratı olan adenzinin artışı S-adenozil homosistein hidrolaz(SAH-hidrolaz)enziminin kataliziyle meydana gelen S-adenozil homosistein (SAH) miktarını artırmaktadır.Bu artış S-adenozil metiyonin

tarafından gerçekleştirilen metilasyon reaksiyonlarını inhibe etmektedir.DNA sentezi için de gerekli olan bu metilasyon reaksiyonlarının engellenmesi hücreler için zararlıdır.

ADA lösemili hastaların tedavisinde kemoterapi hedefi olarak seçilmesinin yanısıra diyagnozda lösemilerinin sub tiplerinin ayrılmasında ve rlapsın takibinde immünolojik markerlerle beraber kullanılan çok önemli biyokimyasal bir parametredir(11,28,78,80). Ayrıca özellikle lösemiler için ADA büyük önem taşımaktadır(14,86).ADA'ın T cell matürasyonu ve mitogenezde çok önemlidir(19,86).

### **3-MATERYAL VE METOD**

#### **3-1. Kullanılan Cihaz ve Kimyasal Maddeler**

##### **3-1-1.Cihazlar**

- Sartorius Basic model dijital terazi
- Waring blendor
- Braun Melsungen homojenizatör
- Beckman dijital pH metre
- Heldolph marka magnetik karıştırıcı
- Beckman model 25 dijital spektrofotometre (VIS-UV)
- Sorvall superspeed SS1 santrifüj
- Whirlmix marka vortex karıştırıcı
- Grant instruments CB2 50Z su banyosu
- ISCO model 1160 soğutmalı fraksiyon kollektörü

- Pharmacia 1.5x80 cm. kolon
- Braund marka 10-100; 100-250 ve 250-1000 µl'lik otomatik transpipetler
- Plastik ve cam laboratuvar malzemeleri

### 3-1-2. Kimyasal Maddeler

Çalışma esnasında kullanılan bütün kimyasal maddeler analiz için gereken biyokimyasal saflıktaydı.

\* Amonyum sülfat  $(NH_4)_2SO_4$ ; Potasyum dihidrojen fosfat  $KH_2PO_4$ ; Disodyum hidrojen fosfat  $Na_2HPO_4$ ; Asetik asit  $CH_3COOH$ ; Sodyum hidroksit  $NaOH$ ; Sodyum pentasiyano nitrosil ferrat  $Na_2[Fe(CN)_5NO].2H_2O$  ve TRIS "Merck"; Adenozin, Kafein, Na-sakkarin, Sephadex G50-150 "Sigma" Histidin hidroklorit, Sistein hidroklorit, glisin ve Dimetil glioksim "Fisher"; Fenol "Baker" firmalarından temin edilmiştir. Hipoklorit ise ticari olarak satılanlardan temin edildi ve hipoklorit miktarı titrasyonla belirlendikten sonra uygun seyreltmeler yapılmak suretiyle kullanıldı. Protein standart'ı olarak Sigma'dan temin edilen sığır serum albumini (BSA) kullanıldı.

### 3-2. Metodlar

Çalışmalar iki safhada gerçekleştirilmiştir. Birinci safhada ADA koyun dalağından izole edilerek kısmen saflaştırıldı, ikinci safhada ise kısmen saflaştırılan enzimin adenozin substratına, değişik efektörler, sıcaklık ve pH'ya karşı aktivitesi tayin edilerek Michaelis-Menten ve Lineveawer-Burk grafikleri çizilerek

kinetik davranışları hakkında fizikokimyasal bilgiler elde edildi.

### 3-2-1.Saflaştırma

ADA'ın saflaştırılmasında J.J.Centelles ve arkadaşlarının sıçan beyin dokusundan ADA'ın saflaştırılmasıyla ilgili metod kısmen modifiye edilerek kullanıldı(44).Saflaştırma işlemi aralıksız 3 gün içerisinde tamamlandı.Saflaştırma kademeleri 2 ila 4°C arasında yapıldı,pH ve spektrofotometrik ölçümler laboratuvar sıcaklığında yapıldı(ort 25°C).Saflaştırma sırasında I=0.05 olan ve pH=7.4, 50mM.TRIS/HCl tamponu (Tampon A).Aktivite tayini ve seyreltme işlemleri sırasında 50mM, pH=6.5 olan Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tamponu (Tampon B) sistemleri kullanılmıştır.Saflaştırma işleminin her kademesinde ADA aktivitesi ve protein tayini yapıldı.

#### Saflaştırma işlemi:

**I.Basamak:**Çalışma materyali olarak Ankara Et ve Balık Kurumunda taze kesilen koyunlardan 4 adet dalak alınarak temiz bir naylon torbaya konulup etrafı buz-su karışımı ile kaplı bir kap içerisinde A.Ü.Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalına getirildi.Dalaklar naylon torbadan çıkarılarak önceden hazırlanmış soğuk 0.185M NaCl çözeltisiyle yıkandı.Derin dondurucuda 15 dakika beklettikten sonra zar kısmı soyularak ayrıldı ve daha sonra makasla küçük dilimler halinde kesildi.Bunlardan 200 g. alınarak 400 ml soğuk TRIS/HCl tamponuyla (50mM,pH=7.4,I=0.05)2 dakika yavaş 2 dakikada hızlı devirde Waring Blendor ile homojenize edildi.1 l'lik bir

mezüre aktarılarak köpük kısmı trompla çekildi böylece ham homojenat elde edildi.

Ham homojenat 15000 devirde 1 saat santrifüj edilip süpernatant cam pamuğundan süzülerek alındı. Elde edilen süpernatant iki eşit kısma ayrılarak bir kısmı derin dondurucuda (-30°C) gerekirse daha sonra kullanmak için saklandı.

**II. Basamak:** I. basamakta elde edilen süpernatant'ın ikinci kısmı 60°C'a ayarlanmış su banyosuna alınıp karıştırılarak 30 dakika bekletildi. Daha sonra +4°C'a soğutulularak 15000 devirde 30 dak. santrifüj edilerek süpernatant kısmı alındı.

**III. Basamak:** II. basamakta elde edilen süpernatant %80 doygunluğa ulaşınca kadar 30 dakika içerisinde azar-azar katı (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ilave edilerek magnetik karıştırıcıyla karıştırıldı. Karışım 15000 devirde 30 dak. santrifüj edildi ve sediment kısmı alınarak 5 katı tamponla dilue edildi. Süspansiyon haline getirilen materyal geçirgenliği 10000gr/mol olan diyaliz membranına alınarak 36 saat TRIS/HCl (50mM, pH 7.4) tamponuna karşı diyaliz edildi. Diyaliz membranından alınan numune tekrar 15000 devirde 30 dak. santrifüj edilerek süpernatant alındı.

**IV. Basamak:** III. basamakta elde edilen süpernatandan istenilen molekül ağırlığındaki proteinleri ayırabilmek için Jel filtrasyonuna tabi tutuldu. Bunun için daha önceden hazırlanan Sephadex G-50-150 jeli kllanıldı.

**Sephadex G-50-150 jel kolonunun hazırlanması:** Kuru sephadex'in 1g'ı tamponla ıslatıldığı zaman yaklaşık 25 ml'lik hacim işgal eder. Buna uygun olarak 8g. sephadex



alınarak 200ml.TRIS/HCl (pH 7.4,50mM)oda sıcaklığında 72 saat şişmeye bırakıldı(38).Daha sonra 1.5x90 cm.boyutlarındaki kolona hava kabarcığı olmayacak şekilde dikkatlice kolon yatak yüksekliği 80cm.olacak şekilde dolduruldu.Kolondan 250ml tampon akış hızı 15ml/saat olacak şekilde ayarlanarak dengelendi.Böylece kolon numune uygulamaya hazır hale getirildi.

**Numunenin kolona uygulanması:**Kolon 12 dakikada bir tüp değiştirecek şekilde programlanarak serolojik pipetle 2ml numune jel üzerine düzgün bir şekilde jel yüzeyini bozmadan uygulandı.Numunenin tamamı jele geçtikten sonra yine düzgün bir şekilde kolonun üst tarafından TRIS/HCl (50mM,pH 7.4)tamponu uygulandı.Kolondan çıkan eluatların absorbanları tampona karşı 280nm.de okundu.Bu işleme absorban değeri 0.002 oluncaya kadar devam edildi ve bundan sonraki fraksiyonlar dikkate alınmadı.

280nm.deki absorbanı yüksek olan tüplerde Lowry metoduna göre protein miktarları ölçülerek fazla protein ihtiva eden tüplerde de ADA aktivitesi tayin edildi.ADA aktivitesi yüksek ve birbirine yakın olan tüpler birleştirilerek kısmen saflaştırılmış stok ADA elde edildi.Elusyon profili"deney sonuçları ve bulgular"da verilecektir.

### **3-2-1-2.ADA aktivitesi Tayini:**

ADA aktivitesi tayini için literatürlerde değişik metodlar mevcuttur(14,35;60)

1. Adenozin----->İnozin dönüşümündeki absorban azalması 265nm.de izlenebilir.

2.İnozin, nükleozid fosforilaz ve ksantin oksidaz etkisiyle ürik aside dönüşür. Bu dönüşüm sırasındaki absorbands artışı 293nm.de takip edilebilir.

3.Adenozin konsantrasyonu polarografik olarak tayin edilebilir.

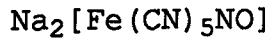
4. Adenozin----->İnozin + NH<sub>3</sub> reaksiyonu sonucu açığa çıkan amonyak miktarı tayin edilebilir.

5.C<sup>14</sup>veya H<sup>3</sup> gibi radyoaktif atom ihtiva eden Adenosin (substrat)kullanarak adenozin----->inozin dönüşümü radyokimyasal olarak ölçülebilir.

Biz çalışmmızda Giuseppe Giusti'nin metodunu uyguladık(4.metot)

**Metodun Prensibi:**

**ADA**



1 No'lu reaksiyon gereği ADA etkisiyle açığa çıkan amonyak alkali ortamda hipoklorit ve fenol ile reaksiyona girerek mavi renkli indofenol oluşturur. Sodyum nitropurissid 2.reaksiyon için katalizördür.Reaksiyondan da anlaşılacağı gibi amonyak konsantrasyonu indofenol'ün absorbandsı ile doğru orantılıdır.ADA tarafından katalizlenen birinci reaksiyon inkübasyon süresi sonunda ilave edilen fenol-nitropurissid çözeltisi ile durdurulur(24).

## Reaktifler:

Reaktiflerin hepsi deiyonize su ile hazırlandı.

**I.Fosfat Tamponu (50mM,pH 6.5):**4.73g.NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O ve 5.62g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>12H<sub>2</sub>O yeterince deiyonize suda çözüldükten sonra 1000ml'ye tamamlanır.

**II.Substrat çözeltisi (21mM adenozin):**140mg adenozin 15 ml tampon içerisinde kaynar su banyosunda çözüldükten sonra soğutulup tamponla 25 ml'ye tamamlanır.

**III.Stok (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çözeltisi (15mM):**1.982g.susuz amonyum sülfat yeterince deiyonize suda çözüldükten sonra 1000ml'ye tamamlanır.

Bundan 0.5ml alınarak tamponla 100ml'ye tamamlanarak standart amonyum sülfat çözeltisi hazırlanır (75µM;0.15µval,NH<sub>3</sub>/ml).

**IV. Fenol/nitropurissid çözeltisi (106mM fenol,0.17mM sodyum nitropurissid):**10g.fenol ve 50mg sodyum nitropurissid 500ml deiyonize suda çözüldükten sonra litreye tamamlanır.

**V.Alkali hipoklorit çözeltisi (11mM NaOCl;125mM NaOH):**125ml 1N NaOH ve 16.4ml %5 lik hipoklorit karıştırıldıktan sonra deiyonize suyla litreye tamamlanır.(Ticari olarak pazarlanan hipoklorit çözeltileri %5w/v NaOCl ihtiva etmektedir. Bu durum Önceden tayin edilerek belirlenmiş ve ondan sonra kullanılmıştır.)

Bütün çözeltiler 0-4°C'de saklanmalı;1,3 ve 4 nolu reaktifler kahverenkli şişede saklanmalıdır.4 no'lu reaktifin rengi yeşil veya kahverengiye dönerse yeniden hazırlanmalı. Bunlar bu şartlarda en az 2 ay

stabildir.Substrat(2 nolu çözelti)ise çalışılacağı zaman taze olarak hazırlanmalıdır.

**Deneyin yapılışı:**

Tablo 2:ADA tayin metodu

| Reaktifler(ml)                                      | Numune | N.Körü | Standart | St.Körü |
|---|--------|--------|----------|---------|
| Tampon  | --     | --     | --       | 0.050   |
| Substrat  | 1.00   | 1.00   | --       | --      |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> St. | --     | --     | 1.00     | --      |
| Numune  | 0.050  | --     | --       | --      |
| Deiyonize su  | --     | --     | 0.050    | 0.050   |
| Fenol nitro pur.                                    | 3.00   | 3.00   | 3.00     | 3.00    |
| Numune  | --     | 0.050  | --       | --      |
| Alkali Hipoklorit                                   | 3.00   | 3.00   | 3.00     | 3.00    |

Tüplerin ağızları parafilmle kapatılarak karıştırılır ve 37°C'lik su banyosunda 1 saat inkübasyonda tutulur.

Tüpler karıştırıldıktan sonra 37°C'lik su banyosunda30 dakika inkübe edilir.

Su banyosundan çıkarıldıktan sonra her bir tüpün absorbansı (620-650nm) optimum 628nm dalga boyunda deiyonize suya karşı okunur.Eğer absorbans 1.000 den büyükse numune 2-5 kat deiyonize suyla seyreltildikten sonra deney yeniden yapılır.

**Hesaplama:**

$$A_n - A_{nk} \times (2 \times 75 / 7.05) \mu M \times 1 \times 7.05 \text{ ml}$$

$$\text{ADA Aktivitesi (IU/L)} = \frac{\text{-----}}{A_s - A_{sk} \times 60 \text{ dak.} \times 0.05 \text{ ml.}}$$

$$A_{\text{numune}} - A_{\text{n.körü}}$$

$$\text{ADA aktivitesi (IU/L)} = \frac{\text{-----}}{A_{\text{stand.}} - A_{\text{stand.körü}}} \times 50$$

IU/L

$$\text{Spesifik aktivite} = \frac{\text{-----}}{\text{mg}_{\text{protein}} \times 10^3}$$

\*Çalışmalarımız süresince enzim ekstraktı B tamponuyla 20 kat seyreltildikten sonra kullanılmıştır. Bundan dolayı sonuç 20 ile çarpılarak yazılmıştır. Bir ünite, bir dakikada mikromol olarak ayrılan amonyak miktarı olarak tarif edilmektedir (24).

\* $A_n$  = Numunenin Absorbansı,  $A_{nk}$  = Numune körünün Absorbansı

$A_{st.}$  = Standart'ın Absorbansı,  $A_{sk}$  = St. Körünün Absorbansı

$10^3$  = ml --> L çevirme faktörü, 7.05 toplam hacim,  $2 \times 75 = \mu\text{mol}$  olarak Standarttaki  $\text{NH}_4^+$  miktarı, 0.05ml olarak numune miktarı, 60 dakika olarak inkübasyon süresi.

### 3-2-1-2. Protein Tayini:

Saflaştırma işlemlerinin her kademesinde protein miktarı Lowry metoduna göre yapıldı (37,38). Protein standartı olarak Sigma'dan temin edilen BSA kullanıldı.

**Metodun Prensipleri:** Alkali ortamda proteinler bakırla ( $\text{Cu}^{++}$ -protein) kompleksi oluşturarak fosfo molibdat-fosfo tungstat reaktifini (Folin-Ciocalteu-Phenol reaktifini) redükleyerek mavi renkli ürün oluşturması esasına dayanmaktadır. Rengin koyuluğu ortamdaki protein konsantrasyonuyla doğru orantılıdır. Folin reaktifinin ilavesinde şu önemli noktaya dikkat edilmesi metodun iyi işlemesi açısından önemlidir. Reaktif yalnız asidik ortamda dayanıklı olmasına rağmen metod gereği redüklenme olayı alkali ortamda ( $\text{pH}=10$ ) gerçekleşmektedir. Bu yüzden folin reaktifi alkali bakır-protein kompleksine ilave edildikten hemen sonra iyice karıştırılmalıdır. Böylelikle folin reaktifi bozulmadan önce redüklenme gerçekleşir.

#### **Reaktifler:**

**A reaktifi:** 0.5g.  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  ve 1.0g.  $\text{Na}_3$ -Sitrat bir miktar deiyonize suda çözüldükten sonra 100ml'ye tamamlanır.

**B reaktifi:** 20g.  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ve 4.0g.  $\text{NaOH}$  bir miktar deiyonize suda çözüldükten sonra litreye tamamlanır.

**C reaktifi:** 50ml B çözeltisi + 1.0ml A çözeltisi karışımı.

**D reaktifi (Folin-Ciocalteu Çözeltisi):** önceden hazırlanan reaktif deiyonize suyla eşit oranda dilue edilerek kullanılır.

### Reaktifin Hazırlanması:

1500ml'lik bir balon jojeye 100g Na-tungstat ( $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), 25g Na-molibdat ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 700ml bidestile su, 50ml %85'lik  $\text{H}_3\text{PO}_4$  ve 100ml konsantre HCl konulup 10 saat geri soğutucu altında yavaş alevde ısıtılır. Soğutulduktan sonra üzerine 100g  $\text{Li}_2\text{SO}_4$ , 50ml bidestile su ve 5 damla Br ilave edilerek 15 dak. kaynatılmak suretiyle Br'un fazlası uçurulur. Tekrar soğutulduktan sonra 1 litrelik bir balon jojeye alınarak bidestile suyla litreye tamamlanır. Koyu renkli şişede muhafaza edilir, kullanılacağı zaman bidestile suyla %50 dilue edilir. Normalde reaktifin rengi parlak sarıdır, yeşil renk oluşursa reaktif bozulmuştur.

### Deneyin Yapılışı:

Tablo 3: Protein tayin metodu

| Reaktif (µl) | Kör  | Numune |
|--------------|------|--------|
| Destile su   | 500  | 490    |
| C reaktifi   | 2500 | 2500   |
| Enzim ext.   | -    | 10     |

Hemen karıştırdıktan sonra laboratuvar sıcaklığında 10 dak. inkübe edilir.

|            |     |     |
|------------|-----|-----|
| D reaktifi | 250 | 250 |
|------------|-----|-----|

Tüplere D-reaktifi ekler eklemes karıştırılıp laboratuvar sıcaklığında 30 dak. beklenir.

En geç 30 dakika içerisinde 700nm.de köre karşı numunenin absorbansı okunur.

**Hesaplama:** Daha önceden BSA standart olarak alınarak grafik çizildi ve grafikten numunedeki protein miktarıyla orantılı olarak her bir standart için absorbans değerleri okunarak  $A=f(\text{proten mg/ml})$  grafiği çizildi. Daha sonra bu grafikten yararlanarak numunelerdeki protein miktarları absorbanslarına bağlı olarak belirlendi. Seyreltmeler dikkate alınarak protein miktarı mg/ml ifade edildi. Yani;

$\text{Protein(mg/ml)} = \text{Grafikten okunan değer} \times F$ ; Bu deney için  
 $F = \text{Standart hacmi (0.5)} / \text{numune hacmi (0.01)} = 50$

Faktör(F) kullanılan numune miktarına bağlı olarak de  
ğişmektedir.

### 3-2-2.ADA'ın Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi

(Bundan sonraki bütün çalışmalar ikişer kez yapıldı ve sonuçlar ikisinin ortalaması olarak alındı.)

#### 3-2-2-1.Değişen Adenozin konsantrasyonunun aktivite üzerine etkisi.

Adenozin substratıyla Michaelis-Menten kinetiğini incelemek için önceden tamponda çözülerek bir stok substrat (21mM adenozin) çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiden uygun seyreltmeler yapılarak son konsantrasyonu 0,5,10,15,20,25,50,100,200,400,600,800,1000 ve 1200µM olacak şekilde çözeltiler hazırlanarak uygun çalışma konsantrasyon aralığı tayin edildi. Bunun sonucu olarak 0,20,30,40,50,100,200,400,600,800ve1000µM'lık aralığın en uygun aralık olduğu belirlendi.

2.1mM'lık stok ADA çözeltisinden Tablo da



belirtilen miktarlarda alınarak yukarıda tesbit edilen aralıkta substrat çözeltileri hazırlandı. Daha önce belirtilen aktivite tayin şemasına göre enzim aktiviteleri tayin edilerek Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri çizildi ve Adenozin için  $K_m$  ve  $V_m$  değerleri tesbit edildi.

Tablo 4: Değişen konsantrasyonlarda Adenozin için deney şeması

| Tüp No            | 1    | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   | 9   | 10  | 11  |
|-------------------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Reaktif( $\mu$ l) |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Tampon            | 1000 | 990 | 985 | 980 | 975 | 950 | 900 | 800 | 700 | 600 | 500 |
| Adenozin          | 0.0  | 10  | 15  | 20  | 25  | 50  | 100 | 200 | 300 | 400 | 500 |
| Enz.Ext.(N)       | 50   | 50  | 50  | 50  | 50  | 50  | 50  | 50  | 50  | 50  | 50  |

Tüpler karıştırıldıktan sonra ağızları parafilmle kapatılıp 37°C'lik su banyosunda 60 dak. İnkübasyonda tutulur.

|             |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|-------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| FNP.        | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 |
| Enz.Ekt.(K) | 50   | 50   | 50   | 50   | 50   | 50   | 50   | 50   | 50   | 50   | 50   |
| Alk.Hip.    | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 |

Tüpler karıştırıldıktan sonra 37°C'lik su banyosunda 30 dak. İnkübe edilir. Bu süre sonunda 628nm'de herbir tüpün

Absorbansı deiyonize suya karşı okunur.

### 3-2-2-2.Değişen Dimetil glioksim konsantrasyonunun ADA aktivitesine etkisi.

Bu deneyde 20mM'lık stok dimetil glioksim çözeltisi hazırlanarak en uygun inhibisyon konsantrasyon aralığını bulmak için 5,10,20,50,100,500,1000,2000,3000,4000,5000,6000,8000 ve 10000µM'lık dimetil glioksim çözeltileri sabit adenozin konsantrasyonunda (800µM) çalışıldı.En uygun aralığın 1,2,3,4,5,6,8 ve 10mM'lık aralık olduğu belirlendi.

Tablo 5:Değişen dimetil gliksim konsantrasyonunun ADA üzerine etkisi için deney şeması

| Tüp No      | 1   | 2    | 3   | 4     | 5   | 6     | 7   | 8   | 9   |
|-------------|-----|------|-----|-------|-----|-------|-----|-----|-----|
| Reaktif(µl) |     |      |     |       |     |       |     |     |     |
| Enz.Ext.    | 50  | 50   | 50  | 50    | 50  | 50    | 50  | 50  | 50  |
| DG.         | 0.0 | 52.5 | 105 | 157.5 | 210 | 262.5 | 315 | 420 | 525 |

Tüpler karıştırıldıktan sonra ağızları parafilmle kapatılarak 37°C'lik su banyosunda 30 dak.inkübe edilir.

|             |     |       |     |       |     |       |     |     |     |
|-------------|-----|-------|-----|-------|-----|-------|-----|-----|-----|
| Tampon      | 600 | 547.5 | 495 | 442.5 | 390 | 337.5 | 285 | 180 | 75  |
| Adenozin(N) | 400 | 400   | 400 | 400   | 400 | 400   | 400 | 400 | 400 |

Tüplerin ağızları parafilmle kapatılıp karıştırıldıktan sonra 37°C'lik su banyosunda 60 dak.inkübe edilir.

|             |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|-------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| FNP         | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 |
| Adenozin(K) | 400  | 400  | 400  | 400  | 400  | 400  | 400  | 400  | 400  |
| Alk.Hip.    | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 |

Tüpler iyice karıştırıldıktan sonra 37°C'lik su banyosunda 30 dak. inkübe edildikten sonra her bir tüpün absorbansı deiyonize suya karşı okunur.

Bu çalışmadan ADA inhibisyonu için 3mM'lık dimetilgliksim konsantrasyonu denendi.

**Tablo 6:Sabit dimetil glioksim(3mM) için çalışma şeması**

---

| Tüp No      | 1   | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    |
|-------------|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Reaktif(ul) |     |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| Enz.Ext.    | 50  | 50    | 50    | 50    | 50    | 50    | 50    | 50    | 50    | 50    |
| DG.         | 0.0 | 157.5 | 157.5 | 157.5 | 157.5 | 157.5 | 157.5 | 157.5 | 157.5 | 157.5 |

---

Tüplerin ağızları kapatılıp karıştırıldıktan sonra 37°C'lik su banyosunda 30 dak. inkübe edilir.

---

|             |      |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
|-------------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Tampon      | 1000 | 832.5 | 827.5 | 822.5 | 817.5 | 792.5 | 742.5 | 642.5 | 542.5 | 442.5 |
| Adenozin(N) | 0.0  | 10    | 15    | 20    | 25    | 50    | 100   | 200   | 300   | 400   |

---

Tüplerin ağızları kapatılarak karıştırılır ve 37°C'lik su banyosunda 60 dak. inkübe edilir.

---

|             |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|-------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| FNP         | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 |
| Adenozin(K) | 0.00 | 10   | 15   | 20   | 25   | 50   | 100  | 200  | 300  | 400  |
| Alk.Hip.    | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 |

---

Tüpler iyice karıştırıldıktan sonra 37°C'lik su banyosunda 30 dakika inkübe edilir ve 628 nm dalga boyunda her bir tüpün absorbansı deiyonize suya karşı okunur.

### **3-2-2-3.Değişen Histidin konsantrasyonunun ADA aktivitesine etkisi.**

Bu deney için dimetil glioksim'de olduğu gibi bir ön çalışma yapılarak uygun inhibisyon konsantrasyon aralığı belirlendi. Tamponda çözerek 1 ve 4mM konsantrasyonunda stok histidin çözeltisi hazırlanarak bundan gerekli miktarlarda alınarak son konsantrasyonu 0,5,10,20,50,100,

500,1000 ve 2000 $\mu$ M konsantrasyon aralığında örnekler hazırlandı.

Tablo 7:Değişen histidin konsantrasyonunun ADA üzerine etkisi için deney şeması

| Tüp No            | 1   | 2    | 3    | 4    | 5    | 6   | 7   | 8     | 9   |
|-------------------|-----|------|------|------|------|-----|-----|-------|-----|
| Reaktif( $\mu$ l) |     |      |      |      |      |     |     |       |     |
| Enz.Ext.          | 50  | 50   | 50   | 50   | 50   | 50  | 50  | 50    | 50  |
| Histidin          | 0.0 | 5.25 | 10.5 | 21.0 | 52.5 | 105 | 525 | 262.5 | 525 |

Tüpler karıştırıldıktan sonra ağızları parafilmle kapatılarak 37°C'lik su banyosunda 30 dak.inkübe edilir.

|             |     |        |       |     |       |     |     |       |     |
|-------------|-----|--------|-------|-----|-------|-----|-----|-------|-----|
| Tampon      | 600 | 594.75 | 589.5 | 579 | 547.5 | 495 | 75  | 237.5 | 75  |
| Adenozin(N) | 400 | 400    | 400   | 400 | 400   | 400 | 400 | 400   | 400 |

Tüplerin ağızları parafilmle kapatılıp karıştırıldıktan sonra 37°C'lik su banyosunda 60 dak.inkübe edilir.

|             |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|-------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| FNP         | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 |
| Adenozin(K) | 400  | 400  | 400  | 400  | 400  | 400  | 400  | 400  | 400  |
| Alk.Hip.    | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 |

Tüpler iyice karıştırıldıktan sonra 37°C'lik su banyosunda 30 dak. inkübe edildikten sonra her bir tüpün absorbansı deiyonize suya karşı okunur.

Bu çalışmadan ADA inhibisyonu için 600 $\mu$ M'lık histidin konsantrasyonu denendi.

Tablo 8:Sabit histidin(600µM) için çalışma şeması

| Tüp No      | 1   | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    |
|-------------|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Reaktif(µl) |     |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| Enz.Ext.    | 50  | 50    | 50    | 50    | 50    | 50    | 50    | 50    | 50    | 50    |
| His         | 0.0 | 157.5 | 157.5 | 157.5 | 157.5 | 157.5 | 157.5 | 157.5 | 157.5 | 157.5 |

Tüplerin ağızları kapatılıp karıştırıldıktan sonra 37°C'lik su banyosunda 30 dak. inkübe edilir.

|             |      |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
|-------------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Tampon      | 1000 | 832.5 | 827.5 | 822.5 | 817.5 | 792.5 | 742.5 | 642.5 | 542.5 | 442.5 |
| Adenozin(N) | 0.0  | 10    | 15    | 20    | 25    | 50    | 100   | 200   | 300   | 400   |

Tüplerin ağızları kapatılarak karıştırılır ve 37°C'lik su banyosunda 60 dak. inkübe edilir.

|             |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|-------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| FNP         | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 |
| Adenozin(K) | 0.00 | 10   | 15   | 20   | 25   | 50   | 100  | 200  | 300  | 400  |
| Alk.Hip.    | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 |

Tüpler iyice karıştırıldıktan sonra 37°C'lik su banyosunda 30 dakika inkübe edilir ve 628 nm dalga boyunda her bir tüpün absorbansı deiyonize suya karşı okunur.

### 3-2-2-4.Değişen sistein konsantrasyonunun ADA aktivitesine tesiri.

Bu çalışma için dimetil glioksimde olduğu gibi değişik konsantrasyon aralıklarında sistein çözeltileri hazırlanarak uygun konsantrasyon aralığı belirlendi.Bunun için tamponla hazırlanan 20mM'lık stok sistein çözeltisinden belirli miktarlarda alınarak son

konsantrasyon 0,1,2,3,4,5,6,8 ve 10mM olacak şekilde deney seti hazırlandı.

Tablo 9:Değişen sistein konsantrasyonunun ADA üzerine etkisi için deney şeması

| Tüp No      | 1   | 2    | 3   | 4     | 5   | 6     | 7   | 8   | 9   |
|-------------|-----|------|-----|-------|-----|-------|-----|-----|-----|
| Reaktif(μl) |     |      |     |       |     |       |     |     |     |
| Enz.Ext.    | 50  | 50   | 50  | 50    | 50  | 50    | 50  | 50  | 50  |
| Sistein     | 0.0 | 52.5 | 105 | 157.5 | 210 | 262.5 | 315 | 420 | 525 |

Tüpler karıştırıldıktan sonra ağızları parafilmle kapatılarak 37°C'lik su banyosunda 30 dak.inkübe edilir.

|             |     |       |     |       |     |       |     |     |     |
|-------------|-----|-------|-----|-------|-----|-------|-----|-----|-----|
| Tampon      | 600 | 547.5 | 495 | 442.5 | 390 | 337.5 | 285 | 180 | 75  |
| Adenozin(N) | 400 | 400   | 400 | 400   | 400 | 400   | 400 | 400 | 400 |

Tüplerin ağızları parafilmle kapatılıp karıştırıldıktan sonra 37°C'lik su banyosunda 60 dak.inkübe edilir.

|             |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|-------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| FNP         | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 |
| Adenozin(K) | 400  | 400  | 400  | 400  | 400  | 400  | 400  | 400  | 400  |
| Alk.Hip.    | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 |

Tüpler iyice karıştırıldıktan sonra 37°C'lik su banyosunda 30 dak. inkübe edildikten sonra her bir tüpün absorbanı deiyonize suya karşı okunur.

Bu çalışmadan ADA inhibisyonu için 500μM'lık sistein konsantrasyonu denendi.

Tablo 10:Sabit sistein konsantrasyonu(500µM) için çalışma şeması

| Tüp No      | 1   | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   | 9   | 10  |
|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Reaktif(µl) |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Enz.Ext.    | 50  | 50  | 50  | 50  | 50  | 50  | 50  | 50  | 50  | 50  |
| Sistein     | 0.0 | 105 | 105 | 105 | 105 | 105 | 105 | 105 | 105 | 105 |

Tüplerin ağızları kapatılıp karıştırıldıktan sonra 37°C'lik su banyosunda 30 dak. inkübe edilir.

|             |      |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-------------|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Tampon      | 1000 | 885 | 880 | 875 | 870 | 845 | 795 | 695 | 595 | 495 |
| Adenozin(N) | 0.0  | 10  | 15  | 20  | 25  | 50  | 100 | 200 | 300 | 400 |

Tüplerin ağızları kapatılarak karıştırılır ve 37°C'lik su banyosunda 60 dak. inkübe edilir.

|             |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|-------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| FNP         | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 |
| Adenozin(K) | 0.00 | 10   | 15   | 20   | 25   | 50   | 100  | 200  | 300  | 400  |
| Alk.Hip.    | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 |

Tüpler iyice karıştırıldıktan sonra 37°C'lik su banyosunda 30 dakika inkübe edilir ve 628 nm dalga boyunda her bir tüpün absorbansı deiyonize suya karşı okunur.

### 3-2-2-5.Değişen kafein konsantrasyonunun ADA aktivitesine tesiri.

Bu çalışma için iki konsantrasyon aralığında çalışma yapıldı.Birincisi 0,5,10,20,50,100,500,1000 ve 2000µM olan ikincisi ise 0,1,2,3,4,5,6,8 ve 10mM olan kısım. Burada sadece ikinci kısım verilmektedir.Bunun için tamponla 20mM'lık stok kafein çözeltisi hazırlandı ve



bundan belli miktarlarda alınarak son konsantrasyonlar yukarıdaki aralığa gelecek şekilde ayarlamalar yapıldı.

Tablo 11:Değişen kafein konsantrasyonunun ADA üzerine etkisi için deney şeması

| Tüp No      | 1   | 2    | 3   | 4     | 5   | 6     | 7   | 8   | 9   |
|-------------|-----|------|-----|-------|-----|-------|-----|-----|-----|
| Reaktif(ul) |     |      |     |       |     |       |     |     |     |
| Enz.Ext.    | 50  | 50   | 50  | 50    | 50  | 50    | 50  | 50  | 50  |
| Kafein      | 0.0 | 52.5 | 105 | 157.5 | 210 | 262.5 | 315 | 420 | 525 |

Tüpler karıştırıldıktan sonra ağızları parafilmle kapatılarak 37°C'lik su banyosunda 30 dak.inkübe edilir.

|             |     |       |     |       |     |       |     |     |     |
|-------------|-----|-------|-----|-------|-----|-------|-----|-----|-----|
| Tampon      | 600 | 547.5 | 495 | 442.5 | 390 | 337.5 | 285 | 180 | 75  |
| Adenozin(N) | 400 | 400   | 400 | 400   | 400 | 400   | 400 | 400 | 400 |

Tüplerin ağızları parafilmle kapatılıp karıştırıldıktan sonra 37°C'lik su banyosunda 60 dak.inkübe edilir.

|             |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|-------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| FNP         | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 |
| Adenozin(K) | 400  | 400  | 400  | 400  | 400  | 400  | 400  | 400  | 400  |
| Alk.Hip.    | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 |

Tüpler iyice karıştırıldıktan sonra 37°C'lik su banyosunda 30 dak. inkübe edildikten sonra her bir tüpün absorbansı deiyonize suya karşı okunur.

Bu çalışmadan ADA inhibisyonu gözlenmediği için deneyin ikinci kısmı yapılmadı.

**3-2-2-6.Değişen Na-Sakkarin konsantrasyonunun ADA aktivitesine tesiri.**

Bu incelemede aynı kafeinde olduğu gibi geniş bir konsantrasyon aralığında denenerek uygun konsantrasyon aralığı arandı.Bu tabloda sadece 0,1,2,3,4,5,6,8 ve 10mM'lık kısım verilmektedir.

**Tablo 12:Değişen Na-sakkarin konsantrasyonunun ADA üzerine etkisi için deney şeması**

| Tüp No             | 1   | 2    | 3   | 4     | 5   | 6     | 7   | 8   | 9   |
|--------------------|-----|------|-----|-------|-----|-------|-----|-----|-----|
| <b>Reaktif(ul)</b> |     |      |     |       |     |       |     |     |     |
| Enz.Ext.           | 50  | 50   | 50  | 50    | 50  | 50    | 50  | 50  | 50  |
| Na-Sakkarin        | 0.0 | 52.5 | 105 | 157.5 | 210 | 262.5 | 315 | 420 | 525 |

Tüpler karıştırıldıktan sonra ağızları parafilmle kapatılarak 37°C'lik su banyosunda 30 dak.inkübe edilir.

|             |     |       |     |       |     |       |     |     |     |
|-------------|-----|-------|-----|-------|-----|-------|-----|-----|-----|
| Tampon      | 600 | 547.5 | 495 | 442.5 | 390 | 337.5 | 285 | 180 | 75  |
| Adenozin(N) | 400 | 400   | 400 | 400   | 400 | 400   | 400 | 400 | 400 |

Tüplerin ağızları parafilmle kapatılıp karıştırıldıktan sonra 37°C'lik su banyosunda 60 dak.inkübe edilir.

|             |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|-------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| FNP         | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 |
| Adenozin(K) | 400  | 400  | 400  | 400  | 400  | 400  | 400  | 400  | 400  |
| Alk.Hip.    | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 | 3000 |

Tüpler iyice karıştırıldıktan sonra 37°C'lik su banyosunda 30 dak. inkübe edildikten sonra her bir tüpün absorbansı deiyonize suya karşı okunur.

Bu çalışmadan ADA inhibisyonu gözlenmediği için deneyin ikinci kısmı yapılmadı.

### 3-2-2-7.Değişen Mg<sup>++</sup>konsantrasyonunun ADA'a etkisi.

Buçalışma için önce 0,5,10,20,50,100,500,1000 ve 2000µM aralığında sonra ise 1,2,5,10,20,30,50 ve 100mM aralığında tamponla MgSO<sub>4</sub> çözeltileri hazırlanarak deneyler yapıldı.Burada sonraki deneye ait uygulama verilmektedir.

Tablo 13:Değişen Mg<sup>++</sup> konsantrasyonunun ADA üzerine etkisi için deney şeması

| Tüp No   | 1    | 2      | 3     | 4      | 5     | 6    | 7     | 8     | 9    |
|--|------|--------|-------|--------|-------|------|-------|-------|------|
| Reaktif(µl)  |      |        |       |        |       |      |       |       |      |
| Enz.Ext.   | 50   | 50     | 50    | 50     | 50    | 50   | 50    | 50    | 50   |
| Mg <sup>++</sup>   | 0.0  | 5.25   | 10.5  | 26.25  | 52.5  | 105  | 157.5 | 262.5 | 525  |
| Tüpler karıştırıldıktan sonra ağızları parafilmle kapatılarak 37°C'lik su banyosunda 30 dak.inkübe edilir. |      |        |       |        |       |      |       |       |      |
| Tampon   | 600  | 594.75 | 589.5 | 573.75 | 547.5 | 495  | 442.5 | 337.5 | 75   |
| Adenozin(N)  | 400  | 400    | 400   | 400    | 400   | 400  | 400   | 400   | 400  |
| Tüplerin ağızları parafilmle kapatılıp karıştırıldıktan sonra 37°C'lik su banyosunda 60 dak.inkübe edilir. |      |        |       |        |       |      |       |       |      |
| FNP  | 3000 | 3000   | 3000  | 3000   | 3000  | 3000 | 3000  | 3000  | 3000 |
| Adenozin(K)  | 400  | 400    | 400   | 400    | 400   | 400  | 400   | 400   | 400  |
| Alk.Hip.   | 3000 | 3000   | 3000  | 3000   | 3000  | 3000 | 3000  | 3000  | 3000 |

Tüpler iyice karıştırıldıktan sonra 37°C'lik su banyosunda 30 dak. inkübe edildikten sonra her bir tüpün absorbansı deiyonize suya karşı okunur.

Bu çalışmadan  $Mg^{++}$ 'nin ADA'ı etkilemediği gözlemlendiği için deneyin ikinci kısmı yapılmadı.

### **3-2-2-8.Sıcaklık değişikliğinin ADA aktivitesine tesiri**

Bu deneyi yapmak için 37,50 ve 65°C sıcaklıklar için su banyoları hazırlandı.4°C için soğutmalı fraksiyon kollektörü,10°C için soğuk oda ve 25°C için de Laboratuvar ortamı kullanıldı.Her bir sıcaklık için Numune,N.körü,standart ve standart körü hazırlanarak ADA aktivitesi tayini için verilen metoda uygun olarak hem 1 saatlik inkübasyon süresi ve hem de 30 dakikalık inkübasyon süresi bu ortamlarda gerçekleştirildi.Bu deneye ait sonuçlar "deney sonuçları ve bulgular" kısmında verilecektir.

### **3-2-2-9.pH değişikliğinin ADA aktivitesine tesiri.**

Bu bölüm için pH değerleri 4,6,6.5,7.4,8 ve 10 olarak seçildi.

pH 4 tamponu  $CH_3COOH/NaOH$  çözeltilerinden,

pH 6,6.5,7.4 tamponları  $KH_2PO_4/Na_2HPO_4$ 'dan,

pH 8 TRIS/HCl çözeltilerinden,

pH 10 ise Glisin/NaOH çözeltilerinden hazırlandı.

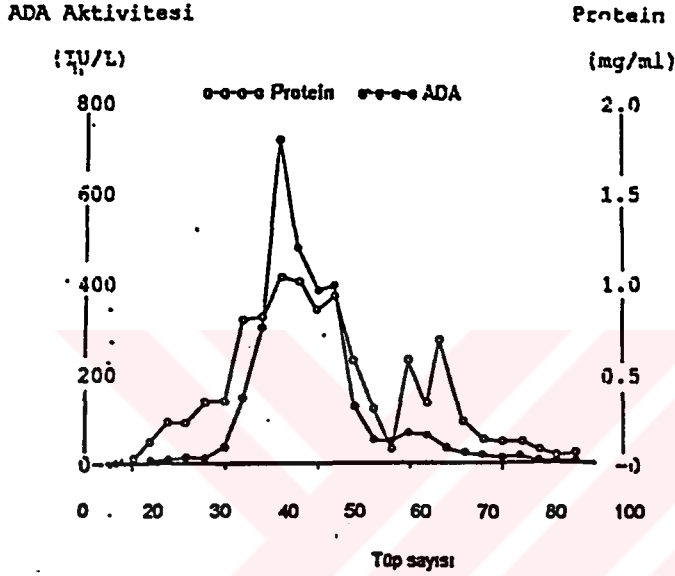
Yine burada da her bir pH için adenzin substratı bu tampon sistemlerinde çözülerek hazırlandı,ayrıca Standart körünede ilgili tamponlar konmak suretiyle daha önce verilen ADA tayin metoduna göre deney yapıldı.

Bu deneye ait değerlerde"deney sonuçları ve bulgular"da tablo halinde verilecektir.

#### 4-DENEY SONUÇLARI VE BULGULAR

4-1.Koyun dalak ADA'nın saflaştırılmasına ait sonuçlar.

##### a) Sephadex G-50-150 elüsyon profili.



Şekil 4-1: Sephadex G-50-150 ADA elüsyon profili

##### b)Talo 4-1:Koyun dalak ADA'nın saflaştırılmasına ait sonuçlar

| Saflaştırma basamağı                               | Hacim (ml) | Protein (mg/ml) | T.protein (mg) | Aktivite (IU/L) | T.Aktivite (IU) | Sp.Akt. IU/mg.Pr | Saf.Oranı | Verim (%) |
|--|------------|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|------------------|-----------|-----------|
| Ham Homojenat                                      | 200        | 60              | 12000          | 12052           | 2410400         | 0.200            | 1         | 100       |
| Sıcaklık etkisi                                    | 140        | 19.6            | 2744           | 9320            | 1304800         | 0.480            | 2.4       | 77.3      |
| %80(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 55         | 3.7             | 203.5          | 8240            | 453200          | 2.230            | 11.15     | 68.4      |
| Sephadex G-50-150                                  | 17         | 0.08            | 1.36           | 1890            | 32130           | 23.63            | 118.2     | 15.7      |

Tablo 4-1 den de anlaşılacağı üzere saflaştırmanın son kademesinde spesifik aktivite 23.63 IU/mg.protein olarak verim %15.7, saflaşıma oranı ise 118.2 kat olarak gerçekleştirilmiştir.

**4-2:Safılaştırılan enzimın kinetik özelliklerine ait sonuçlar.**

**4-2-1:Değişen Adenozin konsantrasyonunun enzim aktivitesine tesiri.**

Üçüncü bölümde açıklandığı şekilde farklı konsantrasyonlarda adenozin çözeltilerine ait deney sonuçları Tablo 4-2de,bu verilere göre çizilen Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleride Şekil 4-2ve3 te görülmektedir.

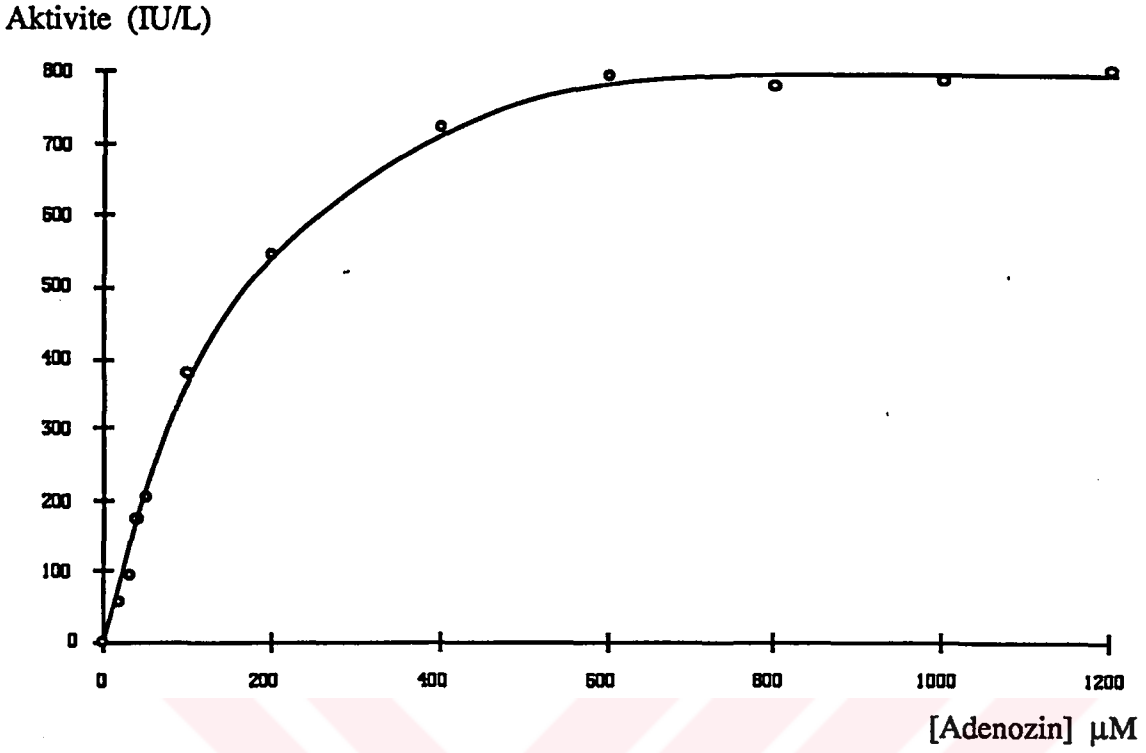
Tablo4-2.Değişen adenozin konsantrasyonunun ADA aktivitesine tesirine ait deney sonuçları

| Tüp No | [Adenozin] $\mu$ M | Aktivite(IU/L) | 1/[Adenozin] $\mu$ M <sup>-1</sup> | 1/Aktivite(IU/L) <sup>-1</sup> |
|--------|--------------------|----------------|------------------------------------|--------------------------------|
| 1      | 0.000              | 0.000          | æ                                  | æ                              |
| 2      | 20.0               | 54.0           | 0.0500                             | 0.0185                         |
| 3      | 30.0               | 95.0           | 0.0330                             | 0.0105                         |
| 4      | 40.0               | 173.0          | 0.0250                             | 0.0058                         |
| 5      | 50.0               | 203.0          | 0.0200                             | 0.0049                         |
| 6      | 100.0              | 377.0          | 0.0100                             | 0.0026                         |
| 7      | 200.0              | 544.0          | 0.0050                             | 0.0018                         |
| 8      | 400.0              | 723.0          | 0.0025                             | 0.0014                         |
| 9      | 600.0              | 820.0          | 0.0017                             | 0.0012                         |
| 10     | 800.0              | 780.0          | 0.0012                             | 0.0013                         |
| 11     | 1000.0             | 787.0          | 0.0010                             | 0.0013                         |
| 12     | 1200.0             | 800.0          | 0.0008                             | 0.0012                         |

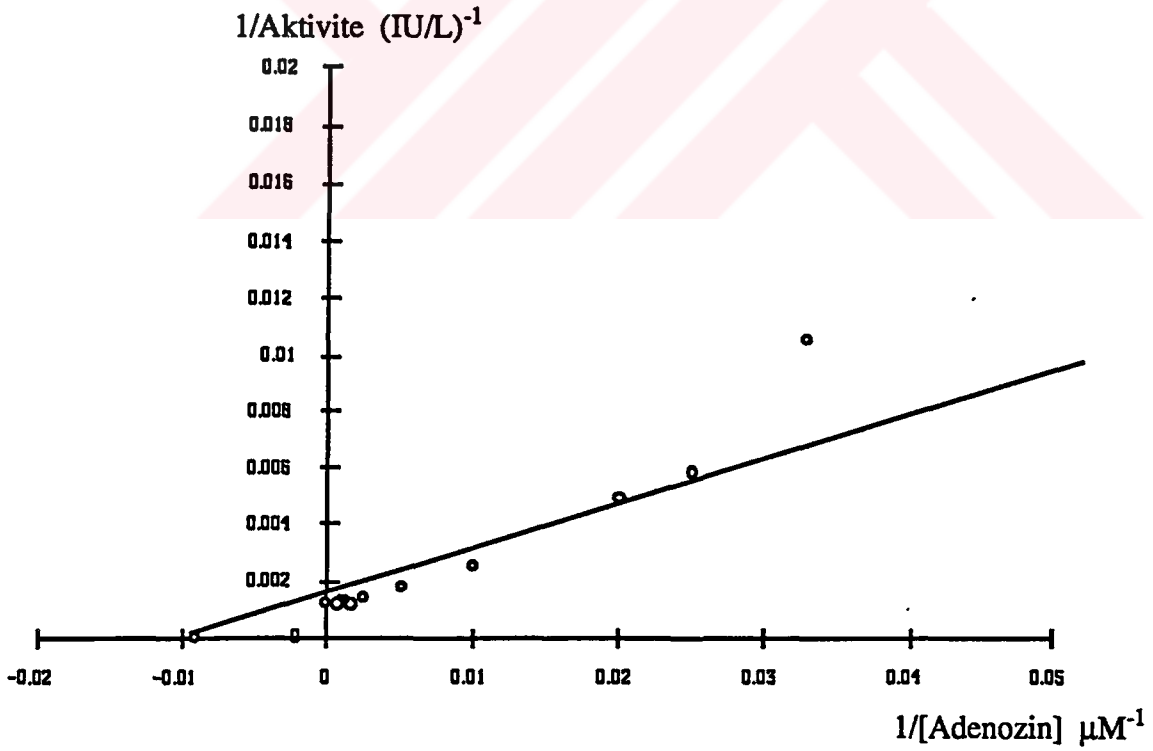
Adenozin substratı için pH=6.5 ve 37°C'de Km=106 $\mu$ M olarak belirlenmiştir.

#### 4-2-2.Değişen dimetil gliksim konsantrasyonunun ADA aktivitesine tesiri

Materyal ve metod kısmında anlatıldığı şekilde değişik konsantrasyonlarda dimetil gliksim çözeltileri hazırlanarak önce en uygun etkinin yapıldığı konsantrasyon aralığı belirlendi.Bu deneye ait sonuçlar Tablo 4-3 te görülmektedir.



Şekil 4.2. Adenosin için Michaelis-Menten grafiği.



Şekil 4.3. Adenosin için Lineweaver-Burk grafiği.



Tablo 4-3:Değişen konsantrasyonlardaki dimetil glioksimin ADA aktivitesi üzerine tesirine ait deney sonuçları

| Tüp No | [Dimetil glioksim]mM | Aktivite(IU/L) | [Adenozin]=800µM |
|--------|----------------------|----------------|------------------|
| 1      | 0.00                 | 842.0          |                  |
| 2      | 1.00                 | 805.0          |                  |
| 3      | 2.00                 | 677.0          |                  |
| 4      | 3.00                 | 616.0          |                  |
| 5      | 4.00                 | 553.0          |                  |
| 6      | 5.00                 | 415.0          |                  |
| 7      | 6.00                 | 358.0          |                  |
| 8      | 8.00                 | 287.0          |                  |
| 9      | 10.0                 | 187.0          |                  |

Yukarıdaki tablodan da anlaşılacağı gibi dimetil glioksim konsantrasyonu arttıkça ADA aktivitesi azalmaktadır.ADA aktivitesini %50 inhibe eden dimetil glioksim konsantrasyonu 5.0mM olarak belirlendi.Deneyimizin ikinci kısmı olan inhibisyon tipini belirlemek için yapılan deneye ait sonuçlar Tablo 4-4'te verilmektedir.Bu deneyde [Dimetil glioksim]=3.0mM olarak alındı.

Tablo4-4.Değişen adenozin konsantrasyonlarında dimetil gliksimin ADA aktivitesine etkisi

| Tüp No | [Adenozin] $\mu$ M | Aktivite(IU/L) | 1/[Adenozin] $\mu$ M <sup>-1</sup> | 1/Aktivite(IU/L) <sup>-1</sup> |
|--------|--------------------|----------------|------------------------------------|--------------------------------|
| 1      | 0.000              | 0.000          | æ                                  | æ                              |
| 2      | 20.0               | 116.0          | 0.0500                             | 0.0086                         |
| 3      | 30.0               | 140.0          | 0.0330                             | 0.0071                         |
| 4      | 40.0               | 142.0          | 0.0250                             | 0.0070                         |
| 5      | 50.0               | 150.0          | 0.0200                             | 0.0067                         |
| 6      | 100.0              | 218.0          | 0.0100                             | 0.0046                         |
| 7      | 200.0              | 408.0          | 0.0050                             | 0.0024                         |
| 8      | 400.0              | 451.0          | 0.0025                             | 0.0022                         |
| 9      | 600.0              | 545.0          | 0.0017                             | 0.0018                         |
| 10     | 800.0              | 557.0          | 0.0012                             | 0.0018                         |
| 11     | 1000.0             | 514.0          | 0.0010                             | 0.0020                         |
| 12     | 1200.0             | 658.0          | 0.0008                             | 0.0015                         |

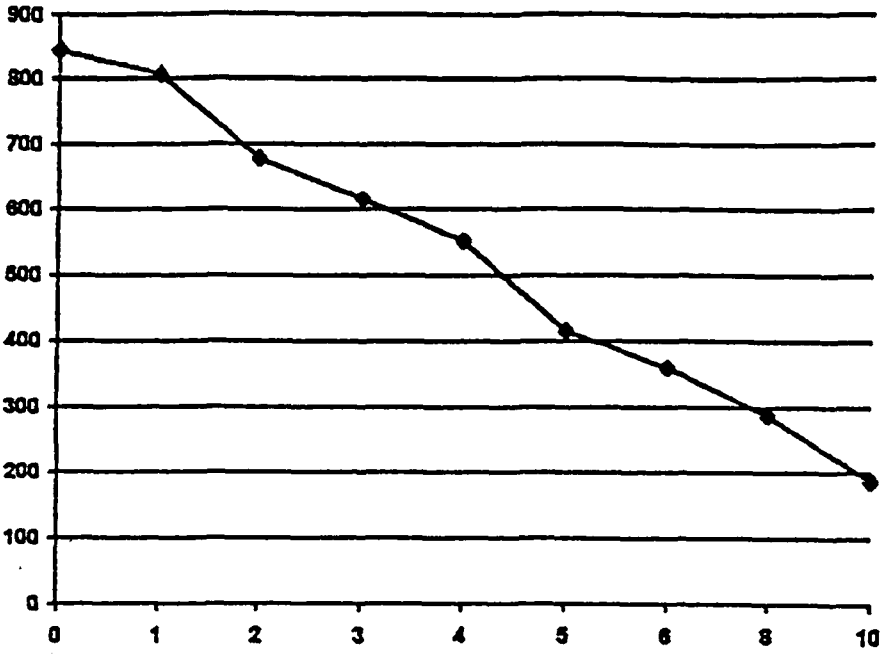
Adenozin substratı için pH=6.5 ve 37°C'de Km=106, Dimetil gliksim için Ki =100 $\mu$ M olarak belirlenmiştir.

Yukarıdaki verilere ait grafikler Şekil 4-4ve4-5,4-6'da görülmektedir.

#### 4-2-3.Değişen histidin konsantrasyonunun ADA aktivitesine tesiri.

Bu çalışma da üçüncü bölümde anlatıldığı şekilde yapılmıştır.Önce tesirli inhibisyon konsantrasyon aralığı belirlendi,daha sonra ise inhibisyon tipini belirlemek için ikinci deney yapıldı.Tesirli konsantrasyon aralığını

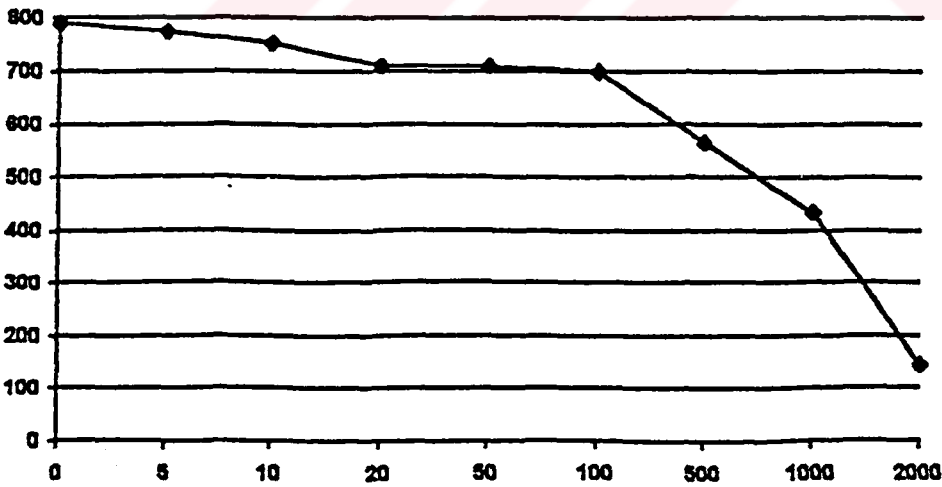
Aktivite (IU/L)



Dimetil glioksim mM

Şekil 4-4: Değişen dimetil glioksim konsantrasyonunun ADA aktivitesine tesiri.

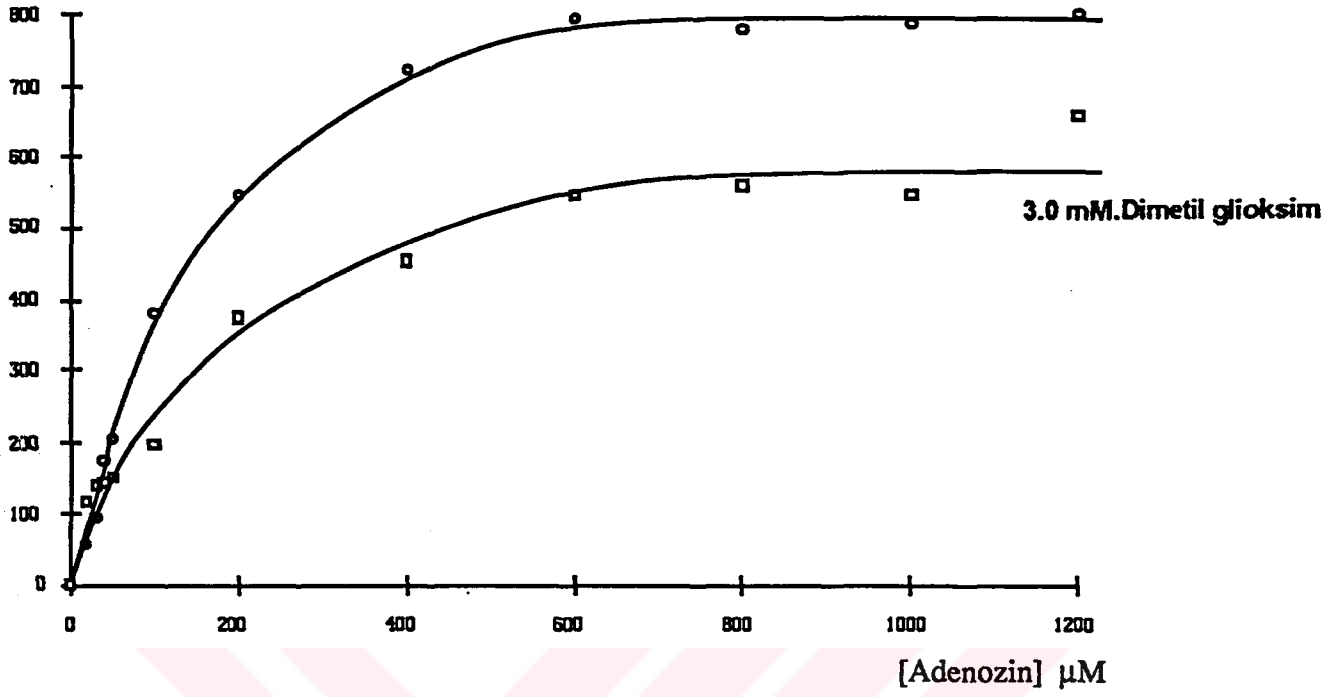
Aktivite (IU/L)



Histidin µM

Şekil 4-7: Değişen histidin konsantrasyonunun ADA aktivitesine tesiri.

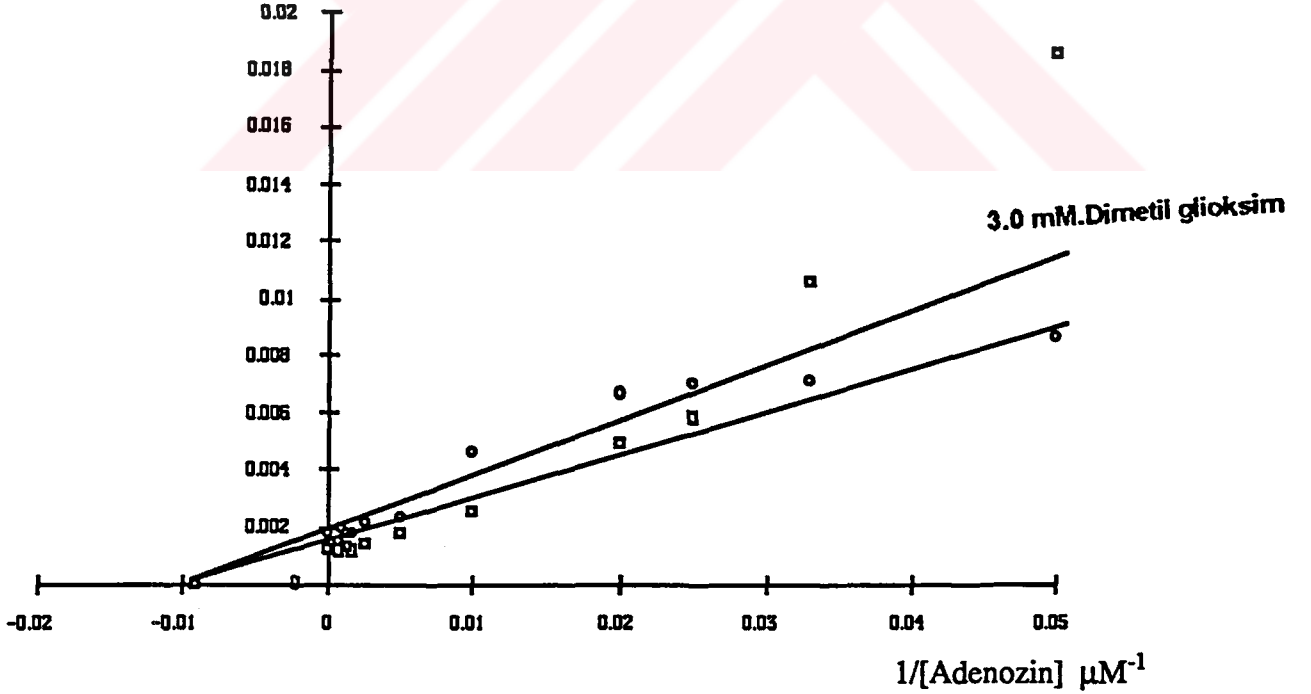
Aktivite (IU/L)



[Adenozin] μM

Şekil 4-5: Değişen konsantrasyonlarda Dimetil Glioksim için Michaelis-Menten grafiği.

1/Aktivite (IU/L)<sup>-1</sup>



1/[Adenozin] μM<sup>-1</sup>

Şekil 4-6: Değişen konsantrasyonlarda Dimetil Glioksim için Lineweaver-Burk grafiği.

belirlemek için yapılan deney sonuçlarına ait veriler Tablo 4-5'te görülmektedir.

Tablo 4-5:Değişen konsantrasyonlardaki Histidinin ADA aktivitesi üzerine tesirine ait deney sonuçları

| Tüp No | [Histidin] $\mu$ M | Aktivite(IU/L) | [Adenozin]=800 $\mu$ M |
|--------|--------------------|----------------|------------------------|
| 1      | 0.00               | 789.0          |                        |
| 2      | 5.0                | 774.0          |                        |
| 3      | 10.0               | 752.0          |                        |
| 4      | 20.0               | 709.0          |                        |
| 5      | 50.0               | 709.0          |                        |
| 6      | 100.0              | 700.0          |                        |
| 7      | 500.0              | 565.0          |                        |
| 8      | 1000.0             | 433.0          |                        |
| 9      | 2000.0             | 144.0          |                        |

Yukarıdaki tablodan da anlaşılacağı gibi histidin konsantrasyonu arttıkça ADA aktivitesi azalmaktadır.ADA aktivitesini %50 inhibe eden histidin konsantrasyonu 910 $\mu$ M olarak belirlendi.Deneyimizin ikinci kısmı olan inhibisyon tipini belirlemek için yapılan deneye ait sonuçlar Tablo 4-6'te verilmektedir.Bu deneyde [Histidin]=600 $\mu$ M olarak alındı.

Tablo4-6.Değişen adenozin konsantrasyonlarında histidinin ADA aktivitesine etkisi

| Tüp No | [Adenozin] $\mu$ M | Aktivite(IU/L) | 1/[Adenozin] $\mu$ M <sup>-1</sup> | 1/Aktivite(IU/L) <sup>-1</sup> |
|--------|--------------------|----------------|------------------------------------|--------------------------------|
| 1      | 0.000              | 0.000          | æ                                  | æ                              |
| 2      | 20.0               | 61.0           | 0.0500                             | 0.0160                         |
| 3      | 30.0               | 57.0           | 0.0330                             | 0.0180                         |
| 4      | 40.0               | 112.0          | 0.0250                             | 0.0090                         |
| 5      | 50.0               | 226.0          | 0.0200                             | 0.0044                         |
| 6      | 100.0              | 327.0          | 0.0100                             | 0.0031                         |
| 7      | 200.0              | 480.0          | 0.0050                             | 0.0021                         |
| 8      | 400.0              | 386.0          | 0.0025                             | 0.0026                         |
| 9      | 600.0              | 480.0          | 0.0017                             | 0.0021                         |
| 10     | 800.0              | 508.0          | 0.0012                             | 0.0020                         |
| 11     | 1000.0             | 488.0          | 0.0010                             | 0.0020                         |
| 12     | 1200.0             | 624.0          | 0.0008                             | 0.0016                         |

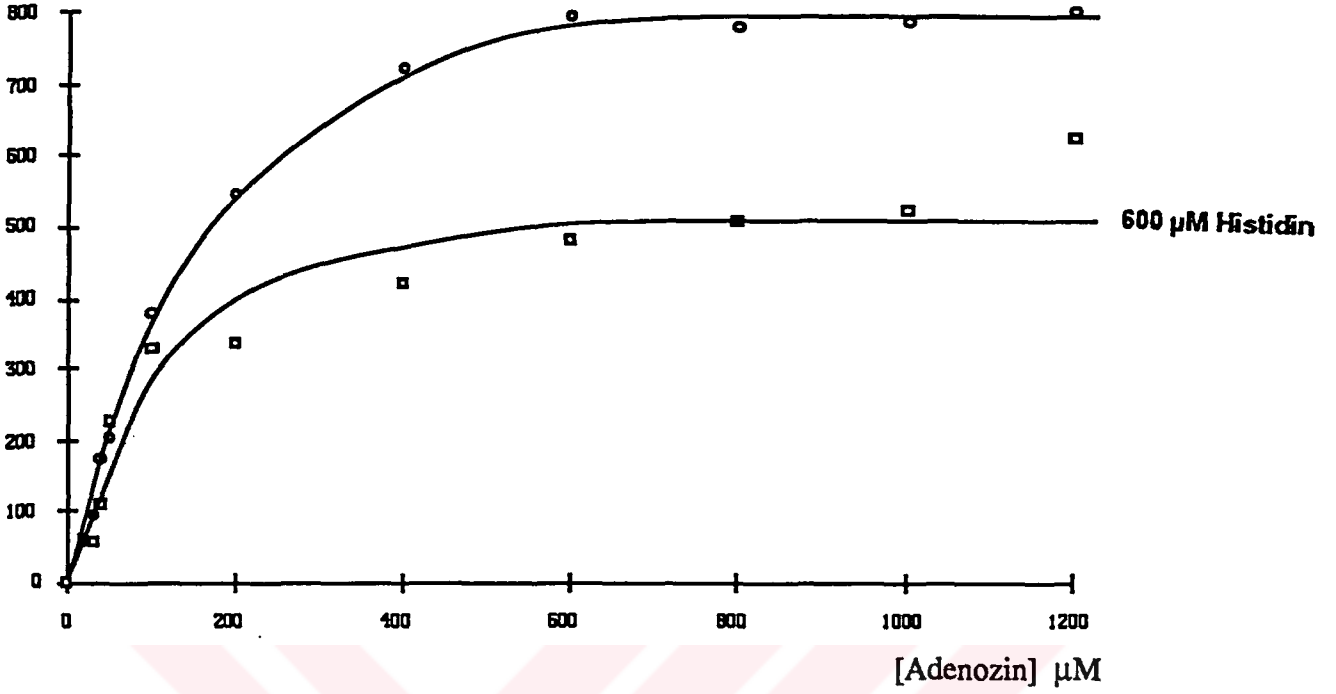
Adenozin substratı için pH=6.5 ve 37°C'de Km=106, Histidin için Ki =135 $\mu$ M olarak belirlenmiştir.

Bu sonuçlara ait grafikler Şekil 4-7 ve 4-8,4-9'da görülmektedir.

#### 4-2-4.Değişen Sistein konsantrasyonunun ADA aktivitesine tesiri

Sisteinin etkisini tesbit etmek için materyal ve metod kısmında belirtildiği gibi önce inhibisyon yapabilecek konsantrasyon aralığı belirlendi.Bundan sonra tesirli konsantrasyon aralığından bir konsantrasyon seçilerek inhibisyon tipinin belirlenmesi için deney

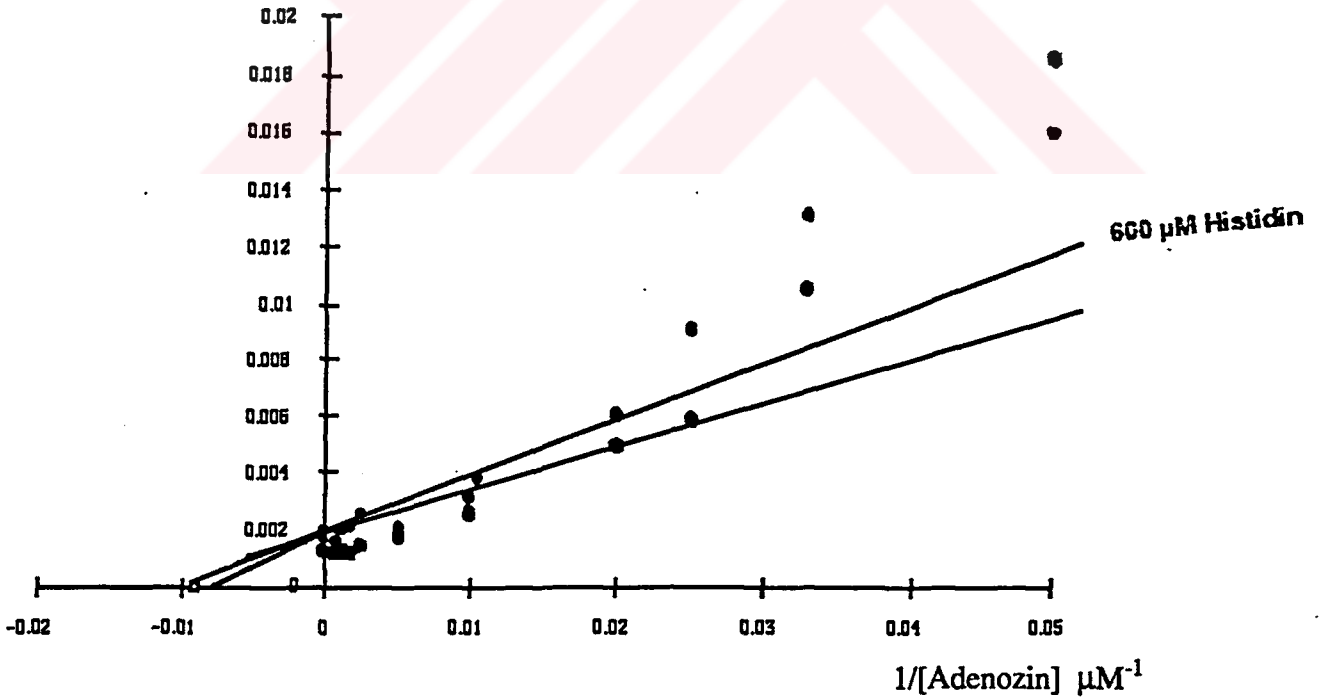
Aktivite (IU/L)



[Adenozin] μM

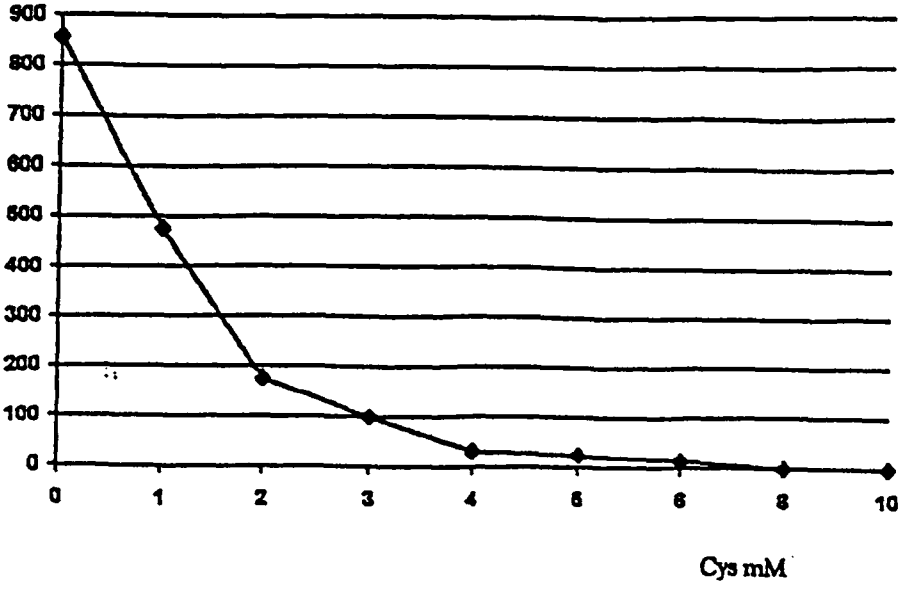
Şekil 4-8: Değişen konsantrasyonlarda Histidin için Michaelis-Menten grafiği.

$1/\text{Aktivite (IU/L)}^{-1}$



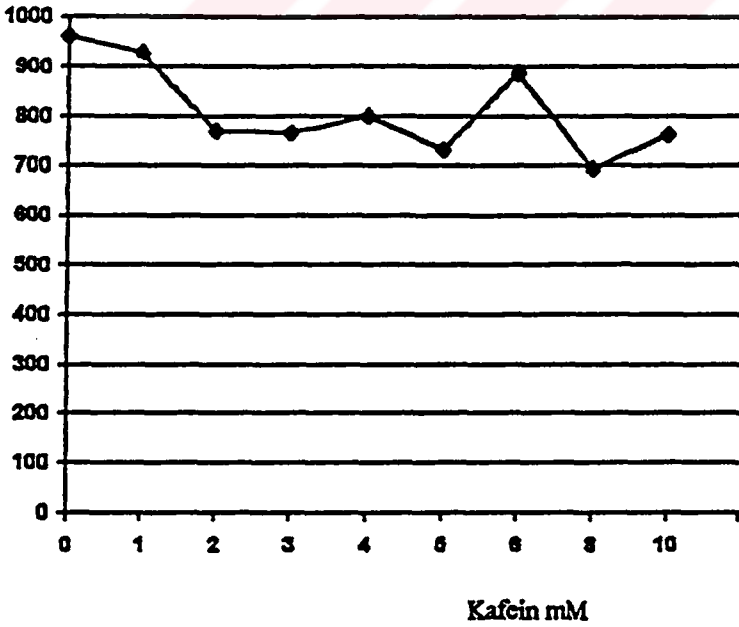
Şekil 4-9: Değişen konsantrasyonlarda Histidin için Lineweaver-Burk grafiği.

Aktivite (IU/L)



Şekil 4-10: Değişen Cys konsantrasyonunu ADA aktivitesine tesiri.

Aktivite (IU/L)



Şekil 4-13: Değişen Kafein konsantrasyonunun ADA aktivitesine tesiri.



yaşıldı. Aşağıdaki tabloda değişen sistein konsantrasyonunun ADA aktivitesine tesirine ait deney sonuçları görülmektedir.

Tablo 4-7:Değişen konsantrasyonlardaki sisteinin ADA aktivitesi üzerine tesirine ait deney sonuçları

| Tüp No | [Sistein]mM | Aktivite(IU/L) | [Adenozin]=800µM |
|--------|-------------|----------------|------------------|
| 1      | 0.00        | 856.0          |                  |
| 2      | 1.00        | 476.0          |                  |
| 3      | 2.00        | 175.0          |                  |
| 4      | 3.00        | 100.0          |                  |
| 5      | 4.00        | 30.0           |                  |
| 6      | 5.00        | 24.0           |                  |
| 7      | 6.00        | 14.0           |                  |
| 8      | 8.00        | 0.0            |                  |
| 9      | 10.0        | 0.0            |                  |

Yukarıdaki tablodan da anlaşılacağı gibi sistein konsantrasyonu arttıkça ADA kuvvetli bir şekilde inhibe olmaktadır.ADA aktivitesini %50 inhibe eden sistein konsantrasyonu 900µM olarak belirlendi.Deneyimizin ikinci kısmı olan inhibisyon tipini belirlemek için yapılan deneye ait sonuçlar Tablo 4-8'de verilmektedir.Bu deneyde [Sistein]=500µM olarak alındı.Bu verilere ait grafikler Şekil 4-10 da görülmektedir.

Tablo4-8.Değişen adenozin konsantrasyonlarında sisteinin ADA aktivitesine etkisi

| Tüp No | [Adenozin] $\mu$ M | Aktivite(IU/L) | 1/[Adenozin] $\mu$ M-1 | 1/Aktivite(IU/L)-1 |
|--------|--------------------|----------------|------------------------|--------------------|
| 1      | 0.000              | 0.000          | æ                      | æ                  |
| 2      | 20.0               | 98.0           | 0.0500                 | 0.010              |
| 3      | 30.0               | 130.0          | 0.0330                 | 0.0077             |
| 4      | 40.0               | 132.0          | 0.0250                 | 0.0076             |
| 5      | 50.0               | 199.0          | 0.0200                 | 0.0050             |
| 6      | 100.0              | 370.0          | 0.0100                 | 0.0027             |
| 7      | 200.0              | 443.0          | 0.0050                 | 0.0023             |
| 8      | 400.0              | 512.0          | 0.0025                 | 0.0020             |
| 9      | 600.0              | 573.0          | 0.0017                 | 0.0017             |
| 10     | 800.0              | 596.0          | 0.0012                 | 0.0017             |
| 11     | 1000.0             | 510.0          | 0.0010                 | 0.0020             |
| 12     | 1200.0             | 573.0          | 0.0008                 | 0.0018             |

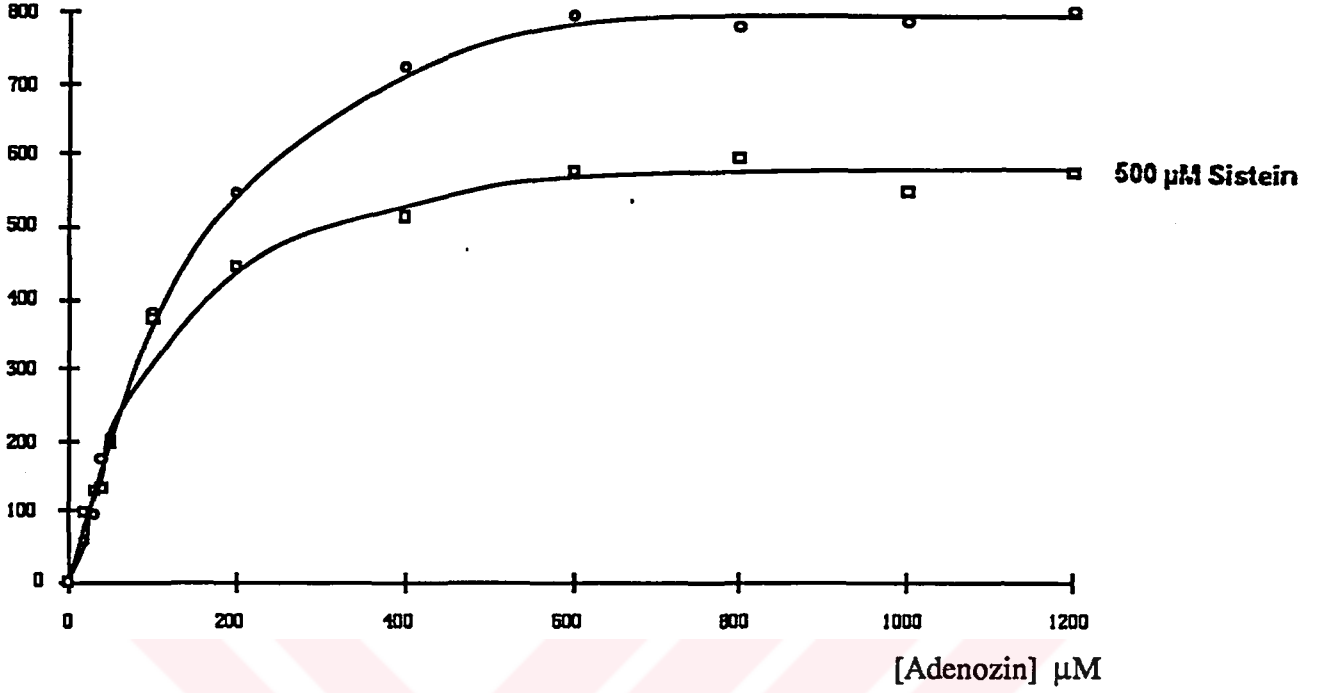
Adenozin substratı için pH=6.5 ve 37°C'de Km=106, Sistein için Ki =90 $\mu$ M olarak belirlenmiştir.

Bu sonuçlarla ilgili grafikler şekil 4-11 ve 12 de görülmektedir.

#### 4-2-5.Değişen Kafein konsantrasyonunun ADA aktivitesine tesiri.

Kafeinin ADA aktivitesine tesirini incelemek için yapılan deneye ait sonuçlar aşağıda Tablo 4-9'da verilmektedir.Geniş konsantrasyon aralığında denemeler yapılmasına rağmen kafeinin ADA aktivitesi üzerinde bir

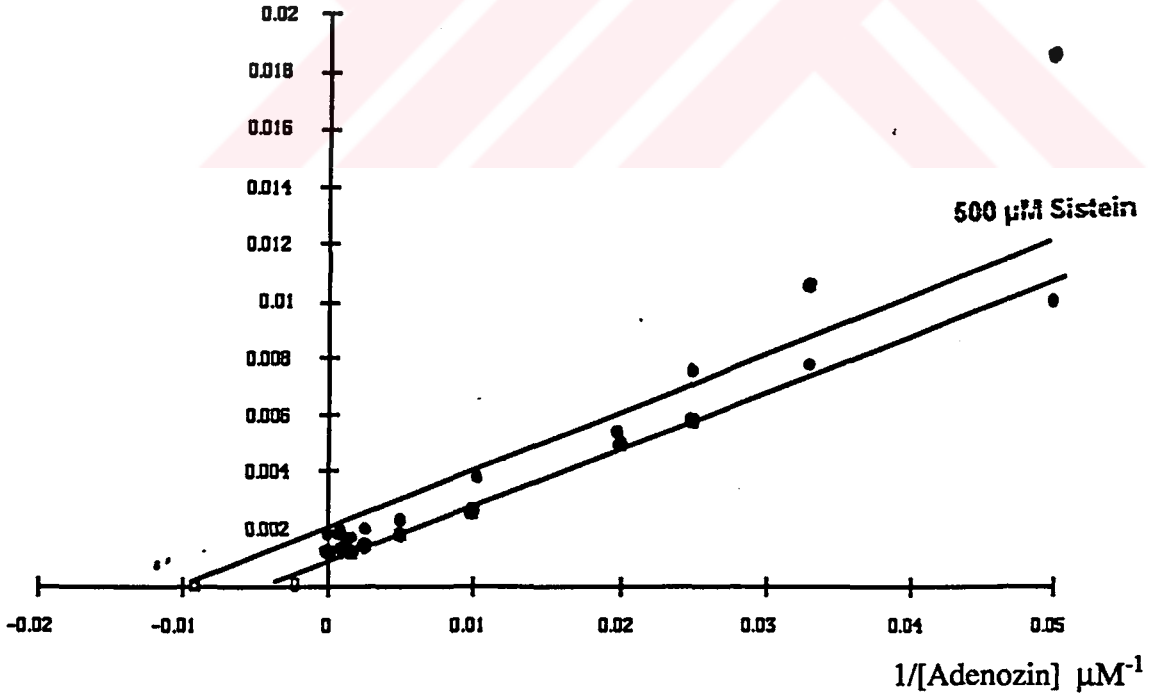
Aktivite (IU/L)



[Adenozin] μM

Şekil 4-11: Değişen konsantrasyonlarda Sistein için Michaelis-Menten grafiği.

1/Aktivite (IU/L)<sup>-1</sup>



1/[Adenozin] μM<sup>-1</sup>

Şekil 4-12: Değişen konsantrasyonlarda Sistein için Lineweaver-Burk grafiği.

tesiri görülmedi. Bu yüzden deneyin ikinci kısmı olan inhibisyon tipini belirleme bölümü yapılmadı.

Tablo 4-9: Değişen konsantrasyonlardaki kafeinin ADA aktivitesi üzerine tesirine ait deney sonuçları

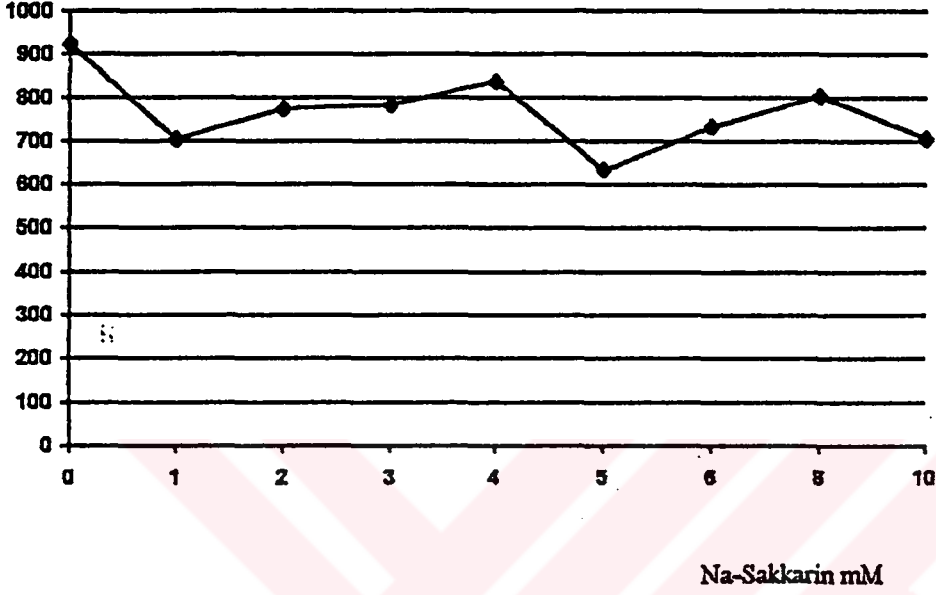
| Tüp No | [Kafein]mM | Aktivite(IU/L) | [Adenozin]=800µM |
|--------|------------|----------------|------------------|
| 1      | 0.00       | 961.0          |                  |
| 2      | 1.00       | 927.0          |                  |
| 3      | 2.00       | 770.0          |                  |
| 4      | 3.00       | 766.0          |                  |
| 5      | 4.00       | 800.0          |                  |
| 6      | 5.00       | 732.0          |                  |
| 7      | 6.00       | 886.0          |                  |
| 8      | 8.00       | 693.0          |                  |
| 9      | 10.0       | 762.0          |                  |

Yukarıdaki tablodan da anlaşılacağı gibi kafein konsantrasyonunun artmasına rağmen ADA aktivitesinde önemli bir değişiklik görülmemektedir. Bu yüzden ikinci kısım deney yapılmamıştır. Deneyle ilgili grafik Şekil 4-13 de görülmektedir.

#### 4-2-6. Değişen Na-Sakkarin konsantrasyonunun ADA aktivitesine tesiri.

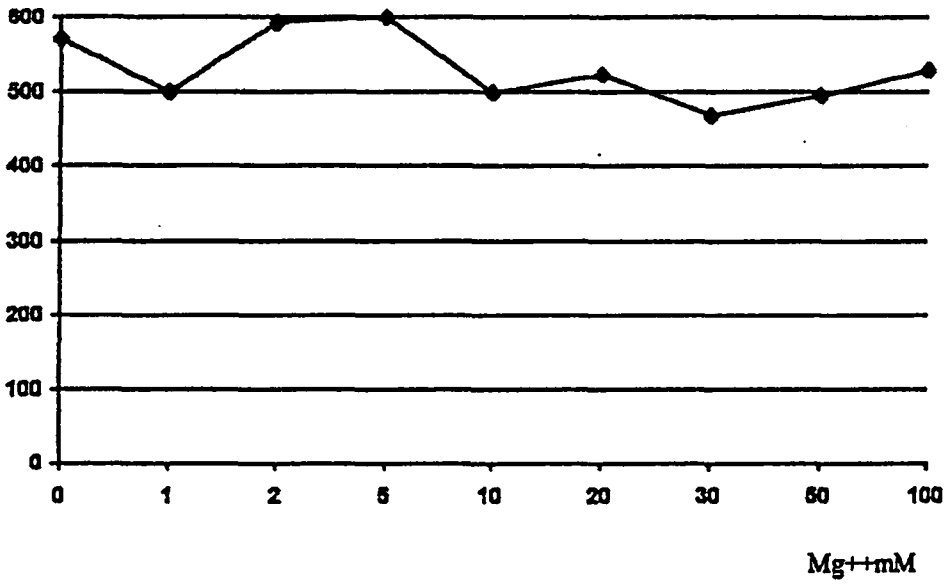
Na-sakkarinin ADA aktivitesine tesirini incelemek için yapılan deneye ait sonuçlar aşağıda Tablo 4-10'da verilmektedir. Na-sakkarin içinde geniş bir konsantrasyon

Aktivite (IU/L)



Şekil 4-14: Değişen konsantrasyonlardaki Na-Sakkarinin ADA aktivitesine tesiri

Aktivite (IU/L)



Şekil 4-15: Değişen konsantrasyonlarda Mg++'un ADA aktivitesine tesiri.

aralığında denemeler yapılmasına rağmen Na-sakkarinin ADA aktivitesi üzerinde bir tesiri görülmedi. Bu yüzden deneyin ikinci kısmı olan inhibisyon tipinin belirlemesi bölümü yapılmadı.

Tablo 4-10:Değişen konsantrasyonlardaki Na-sakkarinin ADA aktivitesi üzerine tesirine ait deney sonuçları

| Tüp No | [Na-Sakkarin]mM | Aktivite(IU/L) [Adenozin]=800µM |
|--------|-----------------|---------------------------------|
| 1      | 0.00            | 923.0                           |
| 2      | 1.00            | 703.0                           |
| 3      | 2.00            | 774.0                           |
| 4      | 3.00            | 782.0                           |
| 5      | 4.00            | 837.0                           |
| 6      | 5.00            | 634.0                           |
| 7      | 6.00            | 732.0                           |
| 8      | 8.00            | 803.0                           |
| 9      | 10.0            | 705.0                           |

Yukarıda tablodan da görüldüğü gibi Na-sakkarin konsantrasyonunun artışı ADA aktivitesinde önemli bir değişikliğe sebep olmamıştır. Bu yüzden ikinci kısım "inhibisyon tipinin belirlenmesi" bölümü yapılmadı. Deneye ait grafik Şekil 4-14 de görülmektedir.

4-2-7. Değişen Magnezyum konsantrasyonunun ADA aktivitesine tesiri.

Genel olarak magnezyum çoğu enzim için aktivatör vazifesi görür. Bu maksatla tez çalışmamızda geniş bir konsantrasyon aralığında  $Mg^{++}$  konsantrasyonunun ADA aktivitesi üzerine tesiri 3. bölümde bahsedildiği gibi gerçekleştirildi. Deneye ait sonuçlar Tablo 4-11'de görülmektedir.

Tablo 4-11: Değişen konsantrasyonlardaki  $Mg^{++}$ 'nin ADA aktivitesi üzerine tesirine ait deney sonuçları

| Tüp No | [ $Mg^{++}$ ]mM | Aktivite(IU/L) | [Adenozin]=800 $\mu$ M |
|--------|-----------------|----------------|------------------------|
| 1      | 0.0             | 571.0          |                        |
| 2      | 1.0             | 500.0          |                        |
| 3      | 2.0             | 593.0          |                        |
| 4      | 5.0             | 600.0          |                        |
| 5      | 10.0            | 498.0          |                        |
| 6      | 20.0            | 522.0          |                        |
| 7      | 30.0            | 468.0          |                        |
| 8      | 50.0            | 494.0          |                        |
| 9      | 100.0           | 528.0          |                        |

Tablodan görüleceği üzere  $Mg^{++}$ 'nin artması ADA aktivitesinde önemli bir aktivasyon veya inhibisyon'a sebep olmamıştır. Bu sebepten "sabit efektör-artan substrat" konsantrasyonuna ait deneme yapılmadı. Deneye ait grafik Şekil 4-15 de görülmektedir.

#### 4-2-8.Sıcaklık artışının ADA aktivitesine tesiri

Bu deneyle ilgili olarak Bölüm 3-2-6 de anlatıldığı gibi farklı sıcaklıklarda sabit ortamlar hazırlanarak deneyin hem 1. ve hem de 2. inkübasyon süreleri buralarda yapılmıştır.Deneye ait sonuçlar Tablo4-12 de verilmektedir.

Tablo4-12.Sıcaklık artışının ADA aktivitesi üzerine tesirine ait deney sonuçları

| Tüp No | Sıcaklık (°C) | Aktivite(IU/L) |
|--------|---------------|----------------|
| 1      | 4.00          | 0.0            |
| 2      | 10.00         | 193.0          |
| 3      | 25.00         | 378.0          |
| 4      | 37.00         | 1193.0         |
| 5      | 50.00         | 1655.0         |
| 6      | 65.00         | 1036.0         |

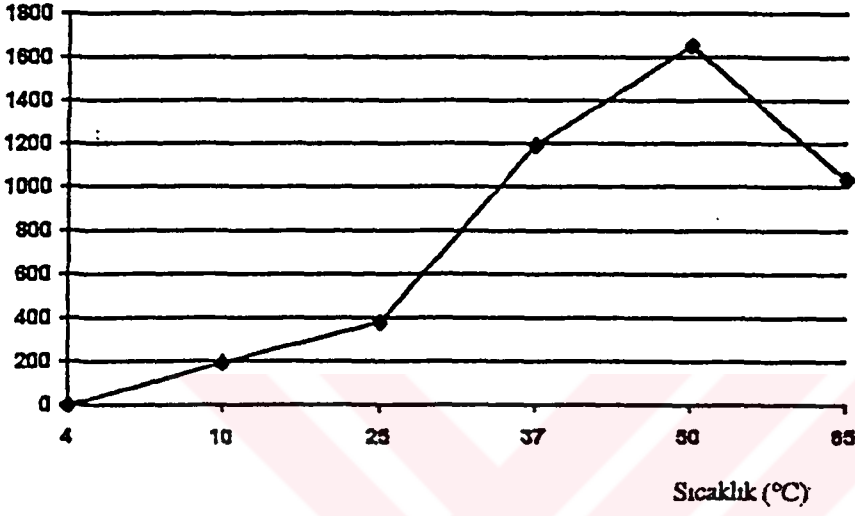
Tablodan da görüldüğü gibi hernekadar inkübasyon süresi 37°C olarak verilse de, yaptığımız deneyde optimum sıcaklığın 50°C olduğu anlaşıldı.65°C dan sonra enzimin aktivitesinin hızlı bir şekilde kaybolduğu gözlenmektedir.Bu sonuçlara ait grafik şekil 4-16'da görülmektedir.

#### 4-2-9.pH değişikliğinin ADA aktivitesine tesiri.

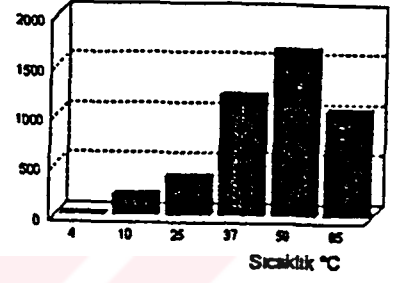
Bu denemeler için materyal ve metod kısmında bahsedildiği gibi farklı pH'larda tampon çözeltiler



Aktivite (IU/L)

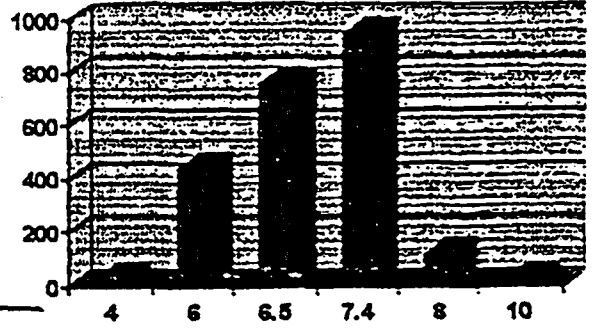
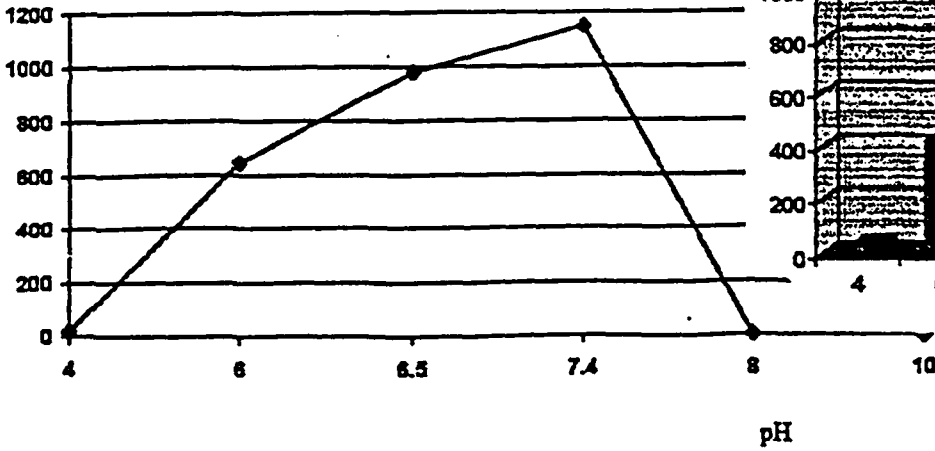


Aktivite (IU/L)



Şekil 4-16: Sıcaklık değişikliğinin ADA aktivitesine tesiri.

Aktivite (IU/L)



Şekil 4-17: pH değişikliğinin ADA aktivitesine tesiri.

hazırlanarak bu pH'larda aktivite tayinleri yapılmıştır. Deneyle ait sonuçlar Tablo 4-13 de verilmektedir.

Tablo 4-13. pH değışikliğinin ADA aktivitesi üzerine tesirine ait deney sonuçları

| Tüp No | pH    | Aktivite(IU/L) |
|--------|-------|----------------|
| 1      | 4.00  | 20.0           |
| 2      | 6.00  | 644.0          |
| 3      | 6.50  | 980.0          |
| 4      | 7.40  | 1149.0         |
| 5      | 8.00  | 4.0            |
| 6      | 10.00 | 0.0            |

ADA aktivitesi tablodan da görüldüğü gibi pH 7.5 tan sonra hızlı bir şekilde azalmakta ve pH 10'da aktivite tayin edilememektedir. Metot'da pH=6.5 te çalışılmasına rağmen deney sonuçları bize koyun dalak ADA enzimi için optimum pH'nın 7.4 olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlara ait grafik şekil 4-17 de verilmektedir.

## 5-TARTIŞMA

Adenozin deaminaz (ADA) bu güne kadar pek çok araştırmacı tarafından çeşitli mikroorganizmalardan, bitkilerden, çeşitli hayvanların ve insanların değişik organ ve dokularından saflaştırılarak fizikokimyasal ve kinetik özellikleri incelenmiştir (14, 23, 31, 35, 40, 44, 45, 46, 47, 48, 56).

Biz bu çalışmamızda ADA enzimini koyun dalağında kısmen saflaştırarak fizikokimyasal ve kinetik özelliklerini inceledik. Bu güne kadar ADA enzimi ile ilgili değişik hayvan ve canlılarda çalışmaların olmasına rağmen koyun dalağıyla ilgili bir çalışmaya rastlayamadık.

Literatürlerde ADA'nın saflaştırılmasıyla ilgili bir çok metod mevcuttur (32, 45, 46, 47, 48, 63, 64, 55, 66, 69, 70, 71, 72, 75). Biz yaptığımız saflaştırma işleminde J.J. Centelles ve arkadaşlarının sıçan beyninden ADA'nın kısmen saflaştırılmasındaki metodu kısmen uyguladık (44). Biz 4. basamakta Sephadex G-50-150 Jel kullandık, bunlar DEAE Sepharoz jeli kullanmışlardır. Saflaştırma basamakları diğer klasik metodlarda olduğu gibi sıcaklığa tabi tutma, amonyum sülfat çöktürmesi, yüksek devirde santrifüj ve jel kromatografisi gibi basamaklardan ibarettir.

Saflaştırma işleminin her basamağında ve daha sonraki yapılan kinetik çalışmalarda ADA aktivitesi tayini - konuyla ilgili pek çok metod olmasına rağmen - kolay uygulanabilirliği ve duyarlılığı sebebiyle Giuseppe Giusti'nin ADA aktivitesi tayin metoduna göre yapıldı (24). Metod gereği ADA substrat olarak adenzini kullanmaktadır. Ancak, enzimin adenzin yanısıra 2'-deoksi adenzinive bazı pürin nükleozidlerini de kullanabilmektedir (24, 47). Ancak pürin halkasının 6'nolu C atomunun elektrofilitelerinden dolayı bu substituentleri daha iyi katalizlemektedir (56). Buna en basit örnek P.M. Murphy ve arkadaşlarının sığır mukozasından saflaştırdıkları ADA'nın 6-kloropürin ribozid'i (52),

J.Phelan ve arkadaşlarının sığır intestinal mukozasından saflaştırdıkları ADA'nın 2'-deoksi adenzini,2'-fluoro adenzini,2,6-diaminopürin ribozidi ve 3'-deoksi adenzini sınırlı miktarlarda kullandığını belirtmektedirler(54).M.Helen Maguire ve arkadaşları ADA'nın spesifikliği ve etki mekanizmasıyla ilgili olarak yaptıkları çalışmalarda substrat olarak kullandıkları pürin analoglarının 6.konumundan hidrolizine ait değerlerini büyükten küçüğe doğru şu şekilde sıralamaktadırlar:Adenzin>6-kloropürin ribozid>6-hidroksilamino pürin ribozid>6-metoksi pürin ribozid.Bu oranlar sadece ayrılan gurubun elektronegativitesiyle ilgili olmayıp pürinlerin pKa1 değerleri üzerine olan etkileri ile de ilgilidir.Etki sırası -Cl>-OCH<sub>3</sub>>-NH-OH>-NH<sub>2</sub> şeklinde olduğunu belirtmektedirler(56).

Enzime ait saflaşma oranlarını mukeyese edebilmek için aynı canlının aynı organ veya dokusundan saflaştırılmalı ki metodun üstünlüğünden veya avantajından bahsedelim.Biz burada kıyaslama yerine literatür bilgileriyle bizim sonuçlarımızı gözden geçireceğiz.

R.Lopez ve ark.'ı yumurta akından yüksek bir verimle(4687 kat) ADA'ı saflaştırarak son basamakta spesifik aktiviteyi 81.14 IU/mg.protein olarak bulmuşlardır(14).W.P.Schrader ve A.R.Stacy insan böbreğinden ADA'ı 10000 kat saflaştırarak son basamakta spesifik aktiviteyi 66 IU/mg protein olarak bulmuşlardır(71).R.F.Hough ve B.L.Bass xenopus laevis

dsRNA ADA'ını 8000 kat saflaştırarak son basamakta sp. akt.120000pmol/saat/mg.protein olarak bulmuşlardır(40).

J.M:Aran ve arkadaşları insan eritrositlerinden ADA'ı 760000 kat saflaştırarak son basamakta sp.aktiviteyi 260870 mIU/mg.protein olarak vermektedirler(32).

Biz yaptığımız saflaştırma işlemi sonunda Sephadex G-50-150 kolonundan elde edilen koyun dalak ADA'ının sp.aktivitesini 23.63IU/mg.protein,saflaştırma oranını ise 118.2 kat %15.7 verimle elde ettik.

Saflaştırılan enzimin kinetik özelliklerine ait deneyleri yaparken mümkün merteye hiç denenmemiş kimyasal maddeleri kullanmaya çalıştık.Bunun için dimetil glioksim, Na-sakkarin, histidin, sistein, kafein ve magnezyumu kullandık.Ayrıca sıcaklık artışının ve pH değişmesinin enzim aktivitesi üzerine olan tesirini araştırdık.

Saflaştırılan enzim üzerinde önce farklı konsantrasyonlarda adenzin çözeltileri hazırlayarak geniş bir aralıkta aktivite tayin ederek en uygun konsantrasyon aralığını 20-800µM olarak belirledik.Daha sonra bu aralıkta farklı konsantrasyonlarda adenzin çözeltileri hazırlayıp aktivite tayini yaparak Michaelis-menten ve Lineweaver-Burk grafiklerini çizdik.çizilen grafiklerden faydalanarak koyun dalak ADA'ına ait Vm ve Km değerlerini sırasıyla 800 IU/L ve 106 µM olarak(50mM, pH 6.5 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tamponu kullanılarak)tesbit ettik.Bu konuyla ilgili olarak yaptığımız literatür incelemelerinde:{değerlendirmelerin hepsi adenzin substratına karşıdır}

P.F.Ma ve J.R.Fisher tavuk karaciğerinden saflaştırdıkları ADA izoenzimleri için farklı sonuçlar elde etmişlerdir.ADA1 için  $K_m=92\mu\text{M}$  iken ADA1 için  $K_m=13\mu\text{M}$  olarak verilmektedir[0.2M,pH 7.0 fosfat tamponu](47).

P.F.Murphy ve arkadaşları sığır mukozasından saflaştırdıkları ADA izoenzimleri için  $V_m$ 'ı 300-550 U/L,  $K_m$  değerlerini ise 15-18 $\mu\text{M}$  olarak bulmuşlardır[0.1M,pH 7 fosfat tamponlu ortam](52).

M.B.van der Weyden ve arkadaşları ise insan dokusundan saflaştırdıkları ADA'nın large,intermediate ve small formları için  $K_m$  değerlerini sırasıyla 90,92 ve 95  $\mu\text{M}$  tesbit etmişlerdir.Small formu bilindiği gibi dalakta bulunan formdur(14).

E.Gabellieri ve arkadaşları Bacilus cereus NCIB 8122 hücrelerinden saflaştırdıkları ADA için  $K_m$  değerini 50 $\mu\text{M}$  civarında hesaplamışlardır [50 mM,pH 7.0-9.9 tris/HCl tamponu olan ortamda](31).

B.Dipa ve arkadaşları insan ADA'sının  $K_m$  değerini 8-45 $\mu\text{M}$  arasında vermektedirler(39).

T. Muraoka ve arkadaşları insan serumundan saflaştırdıkları ADA izoenzimlerinin  $K_m$  değerlerini ADA1 için 440,ADA2 için ise 3700 $\mu\text{M}$  olarak vermektedirler(59).Buna karşılık H.Ratech ve arkadaşları yine insan serum ADA'ına ait  $K_m$  değerini 2800 $\mu\text{M}$  olarak vermektedir(91).

Yukarıda bir kaç örnekten de anlaşılacağı üzere farklı araştırmacılar tarafından ADA enzimi için verilen ortalama  $K_m$  değeri 30-400 $\mu\text{M}$  arasındadır.Buna göre bizim koyun dalak ADA'ı için bulduğumuz 106 $\mu\text{M}$ 'lık  $K_m$  değeri

daha önce belirtilen dalak formu olan small ADA'nın Km değeri olan 97µM'a çok yakındır. Bu küçük farklılık muhtemelen aktivite tayin metodunun farklılığından, grafikten okumadan ve enzim kaynağının farklılığından olabilir.

ADA aktiviteine tesirini araştırmak için kullandığımız kimyasal maddeler:

1-Substratın yapısına benzerliğinden,

2-Enzimin aktif merkezinde bulunduğundan,

3-Enzim aktif merkezinde Zn<sup>++</sup>iyonu bulunduğu için bununla şelet yapabilecek ligand olmasından,

4-Genellikle çoğu enzim için aktivatör olmasına rağmen kimyasal olarak Zn dan daha aktif olmasından dolayı sırasıyla kafein, Na-sakkarin; histidin, sistein; dimetil glioksim ve magnezyum kullanılmıştır.

a) Dimetil glioksim  $\text{CH}_3\text{-C=N-OH}$  yapısında iki dişli  $\text{CH}_3\text{-C=N-OH}$  bir ligand olup

divalent katyonlardan Ni<sup>2+</sup>tayininde kullanılan bir maddedir.

Enzimin aktif merkezinde bulunan Zn<sup>2+</sup> yine merkezde bulunan His, Glu ve Asp ile valans bağı yapmış durumdadır (39, 41, 42, 43). Dimetil glioksim orta dereceden kuvvetli bir ligand olduğu için enzimin aktif merkezindeki Zn metalini bloke ederek enzimin inaktivasyonuna sebep olabileceğini düşünerek uygulama yaptık.

Yaptığımız deney sonunda gerçektende enzimin inhibe olduğunu tesbit ettik. İnhibisyon tipini incelemek için yaptığımız deney sonunda dimetil glioksimin ADA'ı non-

kompetitif olarak inhibe ettiğini tesbit ettik. Literatür araştırmalarında dimetil glioksime ait bilgi bulamadık. Buna benzer şekilde 4 dişli bir ligand olan ancak genellikle MY<sup>2</sup>-formunda bulunan EDTA'nın kullanıldığını fakat bununda ADA üzerinde bir tesirinin olmadığı bildirilmektedir(40). Dimetil glioksime için Ki değerini 100µM olarak hesapladık.

b) Histidinin ADA aktivitesine tesirini incelemek için yaptığımız deneyde His.aminoasidinin enzimi kompetitif olarak inhibe ettiğini belirledik. Histidin için Ki değerini ise 135µM olarak hesapladık.

Literatürde sülfidril ve imidazol gruplarının varlığı enzimin V<sub>m</sub> ve K<sub>m</sub> değerleri üzerinde etkili olduğuna dair bilgiler mevcuttur(44). Histidinin enzimin aktivitesini bariz bir şekilde düşürdüğü de ifade edilmektedir(39).

Histidinin inhibe etmesinin sebebi inhibisyon tipinden de anlaşılacağı üzere enzimin aktif merkezine bağlanmak için adenozinle yarışmaktadır. Aktif merkezdeki Zn<sup>++</sup>'na bağlanmada adenzinden daha aktif olduğu için daha kolay bağlanarak merkezi bloke ederek enzimin kompetitif inhibisyonuna sebep olmakta. Ancak adenzin konsantrasyonu sürekli arttığı için ortamdaki Adenzin/His oranı büyür ve yarışma olayı engellenerek bir müddet sonra reaksiyon V<sub>m</sub> değerine ulaşır.

c) Sistein'in ADA'ı aktif bölgeyi bloke ederek inhibe ettiğine dair bilgiler mevcuttur. Ancak hangi tip inhibisyon yaptığından bahsedilmemektedir(39,44). Ayrıca enzimin yapısında mol başına iki sülfidril grubunun bulunduğu da bahsedilmektedir(56). Biz yaptığımız



deneyin sonunda Cys'in ADA'ı un-kompetitif olarak inhibe ettiğini belirledik.

Bu etki şüphesizki -SH grubunun aktifliğinden kaynaklanmaktadır.Aynı zamanda ADA da olduğu gibi Cys'in -SH grubu bazı enzimlerin de katalitik aktivitesinden sorumludur.-SH grubunun enzim yüzeyinde modifikasyona uğratılması enzimin inaktive olmasına sebep olmaktadır.

Yaptığımız deneyde Cys için Ki değerini 90µM olarak hesapladık.Cys -SH grubunun etkisiyle muhtemelen enzim-substrat kompleksine bağlanarak un-kompetitif inhibisyona sebep olmaktadır.Literatürde sadece inhibe ettiği belirtilmekte,inhibisyon tipinden bahsedilmemektedir (39,44,56).

Enzim 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoik asit) gibi sülfidril bileşikleriyle reaksiyon vermemektedir. 2-Merkaptoetanol ve glutatyonun yüksek konsantrasyonları (7mM)enzimi inhibe etmektedir,glutatyonun inhibisyonu irreversible niteliktedir(56).

d)Kafeinin ADA aktivitesine tesirine ait yaptığımız deney sonucunda her ne kadar konsantrasyon aralığını geniş tutmamıza rağmen hiç bir etki yapmadığını gördük.Bu sonuç literatür bilgilerinde uymaktadır.İnozin,guanozin, adenin ve hipoksantin dışında hiç bir pürin metabolizması araürünlerinin ADA üzerinde inhibitör etki yapmadığı bildirilmektedir(44).

e)Na-Sakkarinide yine kafeinde olduğu gibi pürin yapısına benzediği ve 7 ve 9 no'lu yerlerinde kimyasal olarak birden fazla bağ yapabilme kaabiliyetine sahip olan O ve S atomlarının olması özellik

arzlemektedir.Ancak geniş bir konsantrasyon aralığında deneme yapmamaıza rağmen ADA aktivitesi üzerinde bir tesirinin olmadığını gördük.Na-sakkarinin ADA aktivitesi üzerine tesirine ait bir yayına da rastlayamadık.

f)Magnezyumun ADA aktivitesine tesirini araştırmamızdaki maksat ADA'nın aktif merkezinde  $Zn^{2+}$ 'nın ko-faktör olarak bulunmasıdır(41,42,43,44).Kimyasal olarak  $Mg^{2+}$   $Zn^{2+}$  dan daha aktif olduğu için Zn ile yer değiştirebileceğini ve bunun sonucunun enzim aktivitesine nasıl yansıtacağını araştırdık.Ancak yaptığımız geniş bir konsantrasyon aralığında ( $5\mu M-100mM$ ) $Mg^{2+}$ 'nın ADA aktivitesine hiç bir tesirinin olmadığını gördük.

Bu konuda E.Gabellieri ve arkadaşları yaptıkları çalışmada  $50mM$   $MgCl_2$ 'nin zamana bağlı olarak ( $30^{\circ}C$  da 20 saat bekleterek)enzimi inhibe ettiğini belirtmektedir(31) Sebepini açıklamamışlardır.Ancak bizim bu çalışmaya iki itirazımız var:

1. $30^{\circ}C$  gibi bir sıcaklıkta enzim zaten zamanla aktivitesini belli oranda kaybeder.

2. $MgCl_2$  çözeltisi kullanmak sakıncalıdır.Çünkü  $MgCl_2$ 'ün çözünürlüğü azdır.Aktivite tayini ortamında diğer iyonlarında etkisiyle çözünürlük dahada azalacak (ortak iyon etkisi)ve bulanıklık meydana gelecektir.Buda yanlış sonuçlara sebebiyet verir.Bu sebeple bu tesbitlerine katılmıyoruz.

g)Sıcaklığın enzim aktivitesine tesirini incelemek için farklı sıcaklıklarda aktivite tayinleri yaptık.Yaptığımız çalışmada  $4^{\circ}C$  da reaksiyonun yürümediğini bu sebeple aktivitenin olmadığını, $65^{\circ}C$ 'tan

sonra ise enzimin muhtemelen denatüre olmaya başladığından dolayı aktivitesinin bariz bir şekilde azaldığını tebit ettik. Optimum sıcaklık aralığını ise 30-50°C arasında olduğunu tesbit ettik.

P.F.Murphy ve arkadaşları yaptıkları çalışmada 60°C'da inaktivasyonun ortalama %13,70°C'da ise %79 olduğunu belirtmektedir(52).

J.M.Aran ve arkadaşları ise saflaştırma işleminde 55°C'ta çöktürme yaparak ADA saflaştırması yapmıştır(32).

J.J.Centelles ve arkadaşları yaptıkları çalışma sonunda ADA'nın 21-52°C arasında sıcaklık artışıyla orantılı olarak enzim aktivitesinin de arttığını belirterek ADA aktivitesinin sıcaklığa pek duyarlı olmadığını belirtmektedir(44).

h) Enzimin optimum pH aralığını tesbit etmek için yaptığımız çalışmada pH aralığını 6-7.4 olarak tesbit ettik.  $pH_{op}$  ise 7.4 tür. pH 4 te aktivite çok düşük iken git gide artmakta ancak pH 8 de aktivite birdenbire azalmaktadır, pH 10 da ise aktivite tamamen kaybolmaktadır. Bu durum enzim-substrat kompleksinin pK değeriyle ilgilidir. Reaksiyon kinetiğinde ayrılan grubun yanısıra enzimin ve substratın pKa değerlerinin de etkili olduğu belirtilmektedir(56). Bu durum aktif merkezdeki Zn'nun şelat yapması ile de ilişkilidir(41).

J.J.centelles ve arkadaşları yaptıkları çalışma sonucu pH aralığını 5.05-8.55 olarak(44), G.Elis ve arkadaşları 6-8 arasında optimum 7 olarak (35), M.B.van der Weyden ise 5.5-7.4 olarak(14), E.Gabellieri ve arkadaşları ise 6-11 olarak(31), M.H.Maguire ve arkadaşları 5.8 - 8.8 olarak

vermektedirler(56).Bariz farklılıklar muhtemelen  
safılaştırılan kaynaktan ileri gelmektedir.



## ÖZET

Bu çalışmada koyun dalağında adenozin deaminaz enzimi kısmen saflaştırılarak fizikokimyasal ve kinetik özellikleri araştırıldı.

Saflaştırılan enzimin önce adenozin substratına karşı Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek  $K_m$  değeri  $106\mu M$  olarak hesaplandı. Daha sonra dimetil glioksim, histidin, sistein, kafein, Na-sakkarin, magnezyum, sıcaklık ve pH'nın enzim aktivitesine tesirleri araştırıldı.

Dimetil glioksimin enzimi non-kompetitif, histidin'in kompetitif, sistein'in ise un-kompetitif olarak inhibe ettiği; kafein, Na-sakkarin ve magnezyumun enzimin aktivitesi üzerinde tesirinin olmadığı, optimum sıcaklık aralığının  $35-50^{\circ}C$  arasında ve optimum pH aralığında  $6.0-7.4$  olduğu tesbit edilmiştir.

## SUMMARY

In this study, adenosine deaminase isolated from sheep spleen was partly purified and its physicochemical and kinetic properties were established.

K<sub>m</sub> value of the enzyme against adenosine substrate was found to be 106 μM by using Michaelis-Menten and Lineweaver-Burk equations and graphics. Then, the effects of several chemicals such as dimethylglyoxime, histidine, cysteine, caffeine, Na-saccharin and magnesium and some factors like temperature and pH on the enzyme kinetics were observed. It has been found that,

1. Dimethyl glyoxime is non-competitive, histidine competitive and cysteine un-competitive inhibitors of the enzyme,

2. Caffeine, Na-saccharin and magnesium has no effect on the enzyme activity,

3. The ranges for optimal pH and temperature were 6.0 - 7.4 and 35 - 50°C, respectively.

## KAYNAKLAR

- 1-Grever M.R., Coleman M.S. Balcerzak S.P.: Adenosine deaminase and terminal deoxynucleotidyl transferase: Biochemical markers in the management of chronic myelogenous leukemia. *Cancer Res.* 43:1442-45, 1983.
- 2-Ho A.D. and Geneshaguru K.: Enzymes of purine metabolism in lymphoid neoplasms. Clinical relevance for treatment with enzyme inhibitors. *Klin Wochenscher* 66:467-74, 1988.
- 3-Ho A.D., Dorken B., Ma D.D.F. and et al.: Purine degradative enzymes and immunological phenotypes in chronic B-lymphocytic leukemia: Indication that leukemic immunocytoma is a separate entity. *Br. J. Haematology* 62:545-55, 1986.
- 4-Trangas T., Curtis N., Gounaris A. et al.: Patterns of adenosine deaminase, ecto 5'-nucleotidase, poly(A) polymerase and surface light chain expression in chronic lymphocytic leukemias. *Blut.* 58:187-93, 1989.
- 5-Tristch G.L., Niswander P.W.: Purine catabolism as a source of superoxide in macrophages. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 451: 279-91, 1985
- 6-Balis M.E.: Adenosine deaminase and malignant cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 45:142-49, 1985.
- 7-Dornand J., Bonnafous J.C., Fovero J. and et al.: Ecto 5'-nucleotidase and adenosine deaminase activities of lymphoid cells. *Biochemical Med.* 28:144-56, 1982.

- 8-Murray J.L.,Prez-Soler R.,Byvates D.et al.:Decreased adenosine deaminase and 5'nucleotidase activity in peripheral blood T cells in hodgkin disease.Am.J.Hem. 21:57-66,1986.
- 9-Poplack D.G.,Blatt J.and Reaman G.:Purine pathway enzymes abnormalities in acute lymphoblastic leukemia.Cancer Res.41:4821-32,1981.
- 10-Ratech H.,Martinick F.,Bower W.T.:Differential expression of adenosine deaninase isoenzymes in acute leukemia.Blood 72(5):1627-32,1988.
- 11-Vives J.L.,Rozman C.,Pujades M.D.and et al.:Combined assay of adenosine deaninase,purine nucleoside phosphorilase and lactate dehydrogenase in the early clinical evaluation of Bchronic lymphocytic leukemia.Am.J.Hematology 27:157-62,1988.
- 12-Kate J.T.van den Ingh F.G.M.,Khan P.M.and et al.:Adenosine deaminase complexing protein (ADCP)immunore activity in clorectal adenocarcinomas.Int.J.Cancer 37:479-85,1986.
- 13-Kate J.T.,Wijnen J.T.,van der Grez R.G.M.and et al.:Quantitative changes in adenosine deaminase isoenzymes in human colorectal adenocarcinomas.Cancer Res.44:4688-92,1984.
- 14-Weyden van der M.B. and KellyW.N.:Human adenosine deaminase.The journal of Biol.Chem.251(18):5448-56,1976.
- 15-Seegmiller J.E.:Owerview of possible relation of defects of purine metabolism to immune deficiency.Ann.N.Y.Acad.Sci.451:919,1985.



- 16-Seegmiller J.E.:Disease of purine and pyrimidine metabolism in:Bondy P.K.and Rosenberg L.E.(ed):Metabolic control and disease 857-64,Saunders,1980.
- 17-Agraval R.P. and et al.:Purine metabolism in leukemia.Ann.N.Y.Acad.Sci.451:160-67,1985.
- 18-Carson D.A.,Kaye J.,Seegmiller J.E.:Lymphospecific toxicity in adenosine deaminase deficiency and purine nucleosidase phosphorilase deficiency.Possible role of nucleoside kinase(s).Proc.Natl.Acad.Sci.74(12):5677-84,1977.
- 19-Chechick B.E. and et al.:Association of adenosine deaminase with differentiation of normal and leukemic and B lymphocytes.Ann.N.Y.Acad.Sci.451:169-79,1985.
- 20-Martin D.W.et al.:Metabolism of purine & Pyrimidine nucleotides.In.Harper's Biochemistry.Ed.Martin Jr D.W.and et al.Appletonand LMP,California p 342-59,1991.
- 21-Mitchell B.S.,Kelly W.N.:Purinogenic immune deficiency disease.Clinical features and molecular mechanisms.Ann.Int.Med.92:286-31,1980.
- 22-Adams A.,Harkness R.A.:Adenosine deaminase activity in thymus and other human tissues.Clin.Exp.Immunol.26:647-49,1976.
- 23-Jackson R.C.Morris H.P.and Weber G.:Adenosine deaminase and adenosine kinase in rat hepatomas and kidney tumors.Br.J.Cancer.37:701-13,1978.
- 24-Giusti G.:Enzymes activities.Methods of enzymatic analysis.Ed.Bergmeyer U.H.,Verlag Chemie Gmbh Weinheim, Bergest.21092-98,1974.

- 25-Sheid B.:Adenosine deaminase activity in the regenerating rat liver.Arch.Bioc.Biophys.328(1):259-62,1985.
- 26-Morisaki T.,Fujii H.,Miva S.:Adenosine deaminase in leukemia:Clinical value of plasma ADA activity and characterization of leukemic cell ADA.Am.J.Hematol19:37-45,1985.
- 27-Lal H and et al.:Serum enzymes in head and neck cancer.J.Laryngol.Otol.101:1062-65,1987.
- 28-Drexler H.G.Gaedicke G.,Minowada J.:Biochemical enzyme analysis in acute leukemia.J.Clin.Pathol.38:117-27,1987.
- 29-Grever M.R.,Leiby J.M.,Kraut E.H. and et al.:Low dose deoxyformycin in lymphoid malignancy.J.Clin.Oncology 3(9):1196-1201,1985.
- 30-Zhen Y-Su.,Lui M.S.and Weber G.:Effects of acivicin and dipyrdamole on hepatoma 3924A cells.Cancer Res.43:1616-19,1983.
- 31-Gabellieri E.,Bernini S.,Piras L.and et al.: Purification, stability and kinetic properties of highly purified adenosine deaminase from Bacillus cereus NCIB 8122.Biochimica et Biophysica Acta 884:490-96,1986.
- 32-Aran J.M.,Canela E.I. and franco R.:Peraparative purification adenosine deaminase from human erythrocytes by affinity choromatography.J.Chromatography 532:75-85,1990.
- 33-Ungerer J.P.J.,Oosthozien H.M.,Bissbort S.H. and Vermaak W.J.H.:Serum adenosine deaminase.Isoenzymes and diagnostic application.Clin Chem.38/7:1322-26,1992.

34-Ratech H. and Hirschorn H.: Serum adenosine deaminase in normal and in patient with adenosine deaminase deficient -severe combined immunodeficiency. Clin. Chim. Acta. 115:341-47, 1981.

35-Ellis G. and Goldberg D.M.: A reduced nicotinamide adenine dinucleotide-linked kinetic assay for adenosine deaminase activity. J. Lab. Clin. Med. 76(3):507-16, 1970.

36-Plunket W.: Inhibition of adenosine deaminase to increase the antitumor activity of adenine nucleoside analogues. Ann. N.Y. Acad. Sci. 451:151-59, 1985.

37-Lowry O.H., Rosenbrough et al.: Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265-75, 1951.

38-Deutscher M.P.: Methods in Enzymology V:182, 1990. Guide to protein purification. Ed. by Murray P. Deutscher. Academic press.

39-Dipa B., Medin J., et al.: Mutational analysis of active site residues of human adenosine deaminase. The J. Biol. Chem. 268(8):5464-70, 1993.

40-Hough R.F. and Bass B.L.: Purification of the *Xenopus laevis* double-stranded RNA adenosine deaminase. The J. Biol. Chem. 269(13):9933-39-1994.

41-Grosshans J. and Wolfenden R.: Transition-state discrimination by adenosine deaminase from *Aspergillus oryzae*. Biochim. Biophys. Acta. 1161:28-32, 1993.

42-Wilson D.K. and Quiacho F.A.: A pre-transition-state mimic of an enzyme: X-ray structure of adenosine deaminase with bound 1-deazaadenosine and zinc-activated water. Biochemistry. 32(7):1689-1694, 1993.

- 43-Wilson D.K., Rudolph F.B. and Quijcho F.A.: Atomic structure of adenosine deaminase complexed with a transition-state analog: Understanding catalysis and immunodeficiency mutations. *Science* 252:1278-84, 1991.
- 44-Centelles J.J., Franco R. and Bozal J.: Purification and partial characterization of brain adenosine deaminase: Inhibition by purin compounds and by drugs. *J. Neuroscience Res.* 19:258-67, 1988.
- 45-Brady T.G. and O'Donovan C.I.: A study of the tissue distribution of adenosine deaminase in six mammal species. *Comp. Biochem. Physiol.* 14:101-20, 1965.
- 46-Pfrodner N.: Adenosine deaminase from calf spleen (I. Purification). *Arc. Bioch. and Biophys.* 119:141-46, 1967.
- 47-Ma P.F. and Fisher J.R.: Two different hepatic adenosine deaminases in the chicken. *Biochim. Biophys. Acta.* 159:153-59, 1969.
- 48-Ma P.F. and Fisher J.R.: Multiple adenosine deaminases in the frog (*Rana Catesbeiana*). *Comp. Biochem. Physiol.* 27:105-12, 1968.
- 49-Ma P.F. and Fisher J.R.: Multiple adenosine deaminases in the amphibia and their possible phylogenetic significance *Comp. Biochem. Physiol.* 27:687-94, 1968.
- 50-Ma P.F. and Fisher J.R.: Comparative studies of mammalian adenosine deaminases - some distinctive properties in higher mammals. *Comp. Biochem. Physiol.* 31:771-81, 1969.

- 51-Lopez R.,Cabre F.,Franco R.et al.:Purification of adenosine deaminase from chicken-egg yolk by affinity column chromatography.Preparative Biochemistry.20(3&4): 199-204,1990.
- 52-Murphy P.M.,Noonan M.,Collins P.et al.:Preparative isolation of the isoenzymes of adenosine deaminase from bovine mucosa by ion-exchange chromatography.Biochim. Biophys.Acta.171:157-66,1969.
- 53-Akedo H.,Nishihara H.Shinkai K.and Komatsu K.:Adenosine deaminases of two different molecular size in human tissues.Biochim.Biophys.Acta.212:189-91,1970.
- 54-Phelan J.,McEvoy F.Rooney S.and Brady T.G.:Structural study on adenosine deaminase from calf intestinal mucosa. Biochim.Biophys.Acta.200:370-77,1970.
- 55-Centelles J.J.,Franco R. and Bozal J.:distribution of adenosine deaminase in some rat tissues.Inhibition by ethanol and dimethyl sulfoxide.Comp.Biochem.Physiol.86B (1):95-98,1987.
- 56-Maguire M.H.and Sim M.K.:Studies on adenosine deaminase(2.Specifity and mechanism of action of bovine placental adenosine deaminase).Eur.J.Biochem.23:22-29,1971.
- 57-Muraoka T.,Katsuramaki T.,Shiraishi H.et al.:Automated enzymatic measurement of adenosine deaminase isoenzyme activities in serum.Analitical Biochemistry.187:268-72,1990.

- 58-Philips A.V., Robbins D.J. and Coleman M.S.: Immunoaffinity purification and fluorescence studies of human adenosine deaminase. *Biochemistry*. 26(10):2893-2903, 1987.
- 59-Nair V., Buenger G.S. and Sells T.B.: Inhibition of mammalian adenosine deaminase by novel functionalized 2',3'-dideoxyadenosine. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1078:121-23, 1991.
- 60-Oosthuizen H.M., Ungerer J.P.J. and Bissbort S.H.: Kinetic determination of serum adenosine deaminase. *Clin Chem*. 39/10:2182-85, 1993.
- 61-Schaeffer H.J. and Schwender C.F.: Enzyme inhibitors. 26. Bridging hydrophobic and hydrophilic regions on adenosine deaminase with some 9-(2-hydroxy-3-alkyl)adenines. *J. Medicinal Chemistry*. 17(1):6-8, 1974.
- 62-Kopff M., Zakrzewska I., Czernicki J. et al.: Red blood cell adenosine deaminase activity in multiple sclerosis. *Clinica Chimica Acta*. 214:97-101, 1993.
- 63-Schrader W.P. and Stacy A.R.: Purification and subunit structure of adenosine deaminase from human kidney. *The J. Biological Chem*. 252(18) 6409-15, 1977.
- 64-Schrader W.P., Woodward F.J. and Pollara B.: Purification of adenosine deaminase complexin protein from human plasma. *The J. Biological Chem*. 254(23):11964-68, 1979.
- 65-Parvez Z., Patel N.B. and Nelson J.E.: Urinary adenosine deaminase binding protein, a marker of contrast media induced acute renal damage. *Clinica Chimica Acta*. 190:111-14, 1990.

- 66-Schrader.W.P., Stacy A.R. and Pollara B.:Purification of human erythrocyte adenosine deaminase by affinity column chromatography. *The J. Biological Chem.* 251(13):4026-32, 1976
- 67-Jackson R.C., Leopold W.R. and Ross D.A.:The biochemical pharmacology of (2'-R)-chloropentostatin, a novel inhibitor of adenosine deaminase. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 451: 125-139, 1985.
- 68-Hopkinson D.A., Cook P.J.L. and Harris H.:Further data on the adenosine deaminase polymorphism and a report of a new phenotype. *Ann. Hum. Genet Lond.* 32:361-67, 1969.
- 69-Mitchell B.S., Sidi Y., Hershfield M. et al.:Biochemical consequences of adenosine deaminase inhibition in vivo. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 451:129-37, 1985.
- 70-Camici M., Tozzi M.G., Allegrini S. et al.:Purine salvage enzyme activities in normal and neoplastic human tissues. *cancer Biochem. Biophys.* 11:201-9, 1990.
- 71-Balis M.E.:Adenosine deaminase and malignant cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 451:144-49, 1985.
- 72-Koizumi H., Iizuka H., Aoyagi T. et al.:Characterization of adenosine deaminase from normal human epidermis and squamous cell carcinoma of the skin. *The J. Inv. Dermatol.* 84 (3):199-202, 1985.
- 73-Daddona P.E. and Kelley W.N.:Control of adenosine deaminase levels in human lymphoblasts. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 451:153-63, 1985.
- 74-Daddona P.E. and Kelly W.N.:Analysis normal and mutant form of human adenosine deaminase-a review. *Moll Cell. Biochem.* 29:91-101, 1980.

75-Ingolia D.E., Yeung C.Y., Orengo I.F. and et al.: Purification and characterization of adenosine deaminase from a genetically enriched mouse cell line. *The J. Biol. Chem.* 260(24):13261-67, 1985.

76-Adrian G.S., Hutton G.S.: Adenosine deaminase messenger RNAs in lymphoblast cell lines derived from leukemic patients and patients with hereditary adenosine deaminase deficiency. *The J. Clin. Invest.* 71:1649-60, 1983.

77-Bontemps F., Berghe V.D.G.: Mechanism of adenosine triphosphate catabolism induced by deoxyadenosine and by nucleoside analogues in adenosine deaminase-inhibited human. *Cancer Res.* 49:4983-89, 1989.

78-Caberra M.E.: Immunologic clasification of acute lymphoblastic leukemia. *The Am. J. Ped. Hem./Onc.* 12(3):283-91, 1990.

79-Carson D.A., Kaye J. and Seegmiller J.E.: Differential sensitive of human leukemic T cell lines and B cell lines to growth inhibition by deoxyadenosine. *The J. Immun.* 121(5):1726-31, 1978.

80-Coleman M.S., Greenwood M.F., Hutton J. et al.: Adenosine deaminase, terminal deoxynucleotidil transferase (TdT), and cell surface markers in childhood acute leukemia. *Blood* 52(6):1125-31, 1978.

81-Giblett E.R., Anderson J.E., Cohen F. et al.: Adenosine deaminase deficiency in two patient with severely impaired cellular immunity. *The Lancet* 18:1067-69, 1972.

82-Harb J., Meflah K., Duflos Y. et al.: Purification and properties of bovine liver plasma membrane 5' nucleotidase. *Eur. J. Bioc.* 137:131-38, 1983.



83-Ho.D.A.,Ganeshaguru K.,Knauff W.U.et al.:Clinical respons to deoxyformycin in chronic lymphoid neoplasms and biochemical changes in circulating malignant cell in vivo.Blood 72(6):1884-90,1989.

84-Ho A.D.,Ganeshaguru H.,Knauff W.et al.:Enzyme activities of leukemic cell and biochemical changes induced by deoxyformycin in vitro lack of correlation with clinical response.Leukemia Res.13(4):269-78,1989.

85-Houl T.,Smith J.F.,Allison A.C.et al.:Role of adenosine deaminase in lymphocyte proliferation.Clin Exp. Immunol.23:395-403,1976.

86-Kaplan A.M.,Gerrad T.L.,Stravson J.et al.:Role of adenosine deaminase in human monocyte differentiation and tumor cell cytotoxicity.Ann.N.Y.Acad.Sci.451:264-77,1985.

87-O'Dwyer P.J.,Wagner B.,Jones B.L.et al.:2'-Deoxy-coformycin(pentostatin)for lymphoid malignancies.Ann.Int. Med.108(5):733-43,1988.

88-Zielke C.L.,Suelter C.H.:Purine,purine nucleoside and purine nucleotide aminohidrolases.In Boyer PD (ed):"The enzymes,"vol 4,NY:Academic press,54-64,1971)

89-Weber G:Enzym ology of cancer cells,The New England Journal of Medicine486-493,1977.

90-Weber G:Biochemical strategy of cancer cells and the design of chemotherapy Cancer Research 43:3466-92,1983.

91-Ratech H.and Hirschhorn R.:Serum adenosine deaminase in normals and in a patient with adenosine deaminase deficient-severe combined immunodeficiency. Clin.Chim.Acta.115:341-47,1981.