

Koyun Karaciğer Sitozolik Ahinin Aminotransferaz Enzimine Isı, pH ve Bazı Metal İyonlarının Etkisi. Alanin ve α - Keto Glutarat için Km Değerlerinin Bulunması. *

The Effects of Heat, pH, and Some Metallic Ions on the Sheep Liver Cytosolic Alanine Aminotransferase Enzyme. The Determination of Km Values for Alanine and α - Keto Glutarate.

Gazanfer BİNGÖL** — Şeyma ÖĞÜT**

GİRİŞ

Transaminasyon bitkisel ve hayvansal organizmalarda cereyan eden önemli bir reaksiyon tipidir. Bu olayda esas olarak bir amino asit din amin grubu bir keto aside taşınarak yeni bir amino asit ve ilk amino aside ait keto asit oluşur. Transaminasyon olaylarını katalizleyen enzimlere transaminaz veya aminotransferazlar denir. Hayvansal organizmada başlıca alanin, aspartat, lösin ve tirozin aminotransferaz enzimleri önemlidir.

Çalışmamızın konusunu teşkil eden alanin aminotransferaz (EC 2. 6. 1. 2.) veya GPT enzimi bugüne kadar çeşitli türlerin farklı dokularından elde edilmiş ve bazı özellikleri belirlenmiştir (1, 2, 3, 4, 5). Enzimin mitokondrial ve sitozolik olmak üzere başlıca iki izozimik formu bilinmektedir. Hücredeki total enzimin ancak % 8-15 kadarı mitokondride, kalanı sitozolde bulunmaktadır. Bu oran türden **türe** değişiklik göstermektedir (5, 6, 7). Mitokondrial izozim sitozolik forma göre çok labildir. Enzim mitokondri iç zarından ayrılıp çöktürüldüğünde kısa sürede **büyük** ölçüde aktivite kaybetmektedir. Bu durum muhtemelen enzimin iç zardaki fosfolipit ortamından ayrılması ve faz değiştirmesinden ileri gelmektedir (7, 8, 9,10).

Redaksiyona verildiği tarih : 2 Aralık 1981

* Ecz. Şeyma Öğüt tarafından Biyokimya Biriminde (Birim Başkanı Prof. Dr. Gazanfer Bingöl) hazırlanmış olan "Koyun karaciğeri Sitozolik Alanin Aminotransferaz Enziminin Bazı Biyokimyasal Özellikleri" isimli doktora tezinin bir bölümünden özetlenmiştir. Sınav tarihi : Mart 1981.

** Biyokimya Birimi, Eczacılık Fakültesi, Ankara Üniversitesi.

Koyun Karaciğer Stitozolik Alanin

Bu çalışmada incelenen koyun karaciğer alanin aminotransferaz enzimi (EC 2. 6. 1. 2.) sitozolde % **85-90** oranında bulunmaktadır, literatürde koyun karaciğer GPT enzimi ile ilgili etraflı bir çalışmaya rastlanmadığından, enzimin sitozolik ve mitokondrial formlarının incelenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Enzim kaynağı olarak Et - Balık Kurumu mezbahasından temin edilen taze koyun karaciğeri kullanıldı.

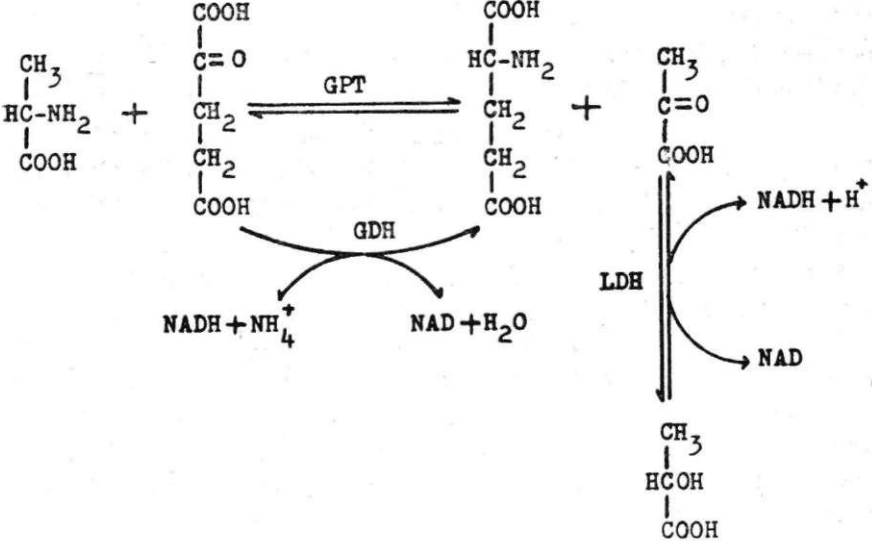
Gereçler : İndirgenmiş nikotin amid adenin dinükleotid (NADH), laktik dehidrogenaz (LDH), sığır serum albümini (BSA), 2-merkaptanol, L - prolin SIGMA; alanin, α - keto glutarat, tris, amonyum sülfat, metal tuzları, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 MERCK; Sephadex G - 200 ve DEAE Sephadex A - 25 PHARMACIA firmalarından temin edildi.

Spektrofotometrik işlemler Pye Unicam SP **8-100**, santrifüj işlemleri Sorvall SS - 3 ve Ecco - Superior IV BK soğutmalı santrifüjleri ile yapıldı.

Yöntemler : Alanin aminotransferaz etkinliğinin tayini :

Etkinlik tayinlerinde Welch tarafından önerilen yöntem uygulandı (**11**). Total hacim **2 ml** olacak şekilde **1.5 ml 0.3 M** Tris-HCl pH = **8.0** **0.2 ml 40 mg/ml** α - keto glutarat pH = **7.0**, **1 ml 20 mg/ml** alanin pH = **7.0**, **0.2 ml 10 U/ml** LDH, **0.1 ml 3 mg/ml** NADH (Tris - HCl tampon içinde) ve **10 μ l** enzim karıştırıldı. Kör olarak enzim içermeyen karışım kullanıldı. Enzim birimi **1** dakikada **1 μ mol** NADH'ı NAD'ye oksitleyen enzim miktarıdır.

Enzimatik tepkime aşağıdaki şekilde olmaktadır :



Protein tayinleri : Lowry (12) ve Warburg yöntemlerine göre yapıldı (13).

Sitozolik enzimin elde edilmesi : Taze olarak alınan koyun karaciğeri buz içinde laboratuvara getirilerek soğuk 0.05 M Tris-HCl, 0.1 M KCl, 0.01 M alanin pH = 8.0 tamponu ile birkaç kez yıkandı ve kıyma makinasından geçirildi. Cam - teflon homojenizatörde % 30 - 40 homojenatı hazırlandı ve süzüldü. Elde edilen süspansiyon 45°C de 5'isi denaturasyonuna tabi tutuldu. Bu sürenin sonunda buzlu suda 5°C ye kadar soğutuldu. Çöken proteinler soğukta **6000** devirde 10' santrifüj edilerek ayrıldı. Supernatana % 30-45 amonyum sülfat kesiti uygulandı ve çökelek santrifüj edilerek toplandı. Toplanan enzim 0.05 M Tris-HCl, 0.1 M KCl, 10⁻³M 2-merkapto etanol pH = 7.8 tamponuna karşı soğukta diyaliz edilerek yine aynı tamponla dengeli Sephadex G - 200 kolonundan geçirildi. Tek bir pik halinde kolondan çıkan enzim, % 60 (NH₄)₂ SO₄ doygunluğuna getirilerek santrifüj edildi ve çökelek alındı. Bu çökelek

Koyun Karaciğer Stitozolik Alanin

0.025 M Tris - HCl, 10^{-2} M 2 - merkapto etanol pH = 7.8 tamponuna karşı diyaliz edilerek yine aynı tamponla dengeli DEAE - Sephadex A - 25 kolonuna uygulandı, Kolonda tutulan enzim 0.05 M Tris-HCl, 0.5 M KCl, 10^{-2} M 2 - merkapto etanol pH = 7.8 gradienti ile elde edildi. Aktif fraksiyonlar birleştirilerek % 65 $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ doygunluğunda çöktürüldü.

pH deneyleri : İyon değiştirici kolondan elüe edilen enzimin farklı pH'lardaki aktivitesini izlemek için pH = 6.5 ile 9.5 arasında 0.3 M fosfat, Tris - HCl ve bikarbonat tamponları hazırlandı ve aktivite ölçümleri yapıldı.

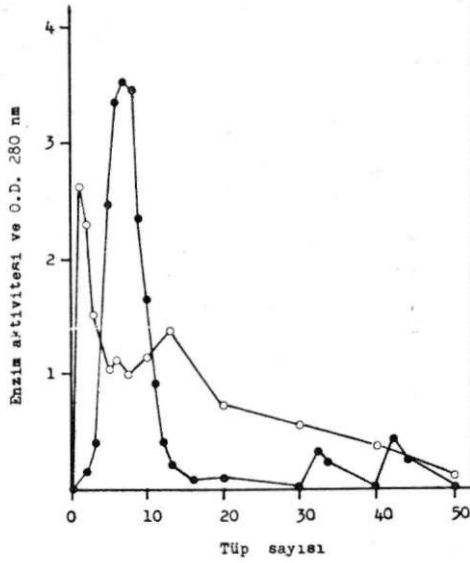
Isı deneyleri : İyon değiştirici kolondan alınan ve katı amonyum sülfat ile çöktürülen enzim, 0.05 M Tris - HCl, 10^{-2} M 2 - merkapto etanol pH = 7.8'e karşı diyaliz edilerek elde edilen enzim çözeltisine farklı sıcaklık derecelerinin etkisi incelendi. Bunun için spektrofotometre kuvvetleri 27 - 47°C ler arasında sıcak su sirkülasyonu ile ısıtılarak normal enzim aktiviteleri ölçüldü. Bu deneye paralel olarak 0.01 M L - prolin içeren deney ortamında aktivite ölçümleri tekrarlandı. Sonuçlar grafikte gösterildi.

Metal iyonlarının etkisi : 0.025 M Tris - HCl ile elüe edilen enzime bazı metal iyonlarının etkisini incelemek için son konsantrasyon 10^{-3} M olacak şekilde deney ortamına MgCl_2 , NaCl, KCl, LiCl, CaCl_2 , NH_4Cl , CuSO_4 , SnCl_2 , CdCl_2 , FeCl_3 ilave edildi. 30° de aktiviteler ölçüldü. Deneyler sırasında diğer substrat miktarlarında değişiklik yapılmadı.

Alanin ve α - keto glutarat için Km değerleri tayini : GPT enzimi çift substratlı olarak tepkimeye girdiğinden önce alanin sabit a - keto glutarat değişken, sonra α - keto glutarat sabit alanin değişken substrat olarak alındı ve 30°C de enzimatik hızlar ölçüldü. Seçilen alanin konsantrasyonları 0.374, 0.748, 1.119, 1.496, 1.870, 2.33 mM'dir. İlk üç değer sabit konsantrasyon olarak alınmıştır. α - keto glutarat konsantrasyonları 0.074, 0.149, 0.223, 0.299, 0.374, 0.467 mM'dir. İlk üç değer sabit konsantrasyon olarak alınmıştır. Deneyler sonucu elde edilen hızların 1/v değerleri alınarak 1/S'e karşı lineweaver-Burk eğrileri çizildi. Eğrilerin -x eksenini kestiği noktalar 1/sabit substrat konsantrasyonuna karşı tekrar grafiğe geçirilerek alanin ve α - keto glutarat için Km değerleri bulundu (14>

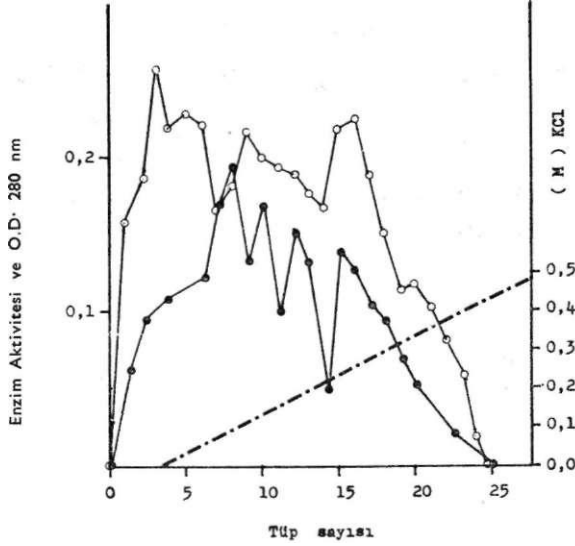
BULGULAR

Koyun karaciğeri alanin aminotransferaz enzimi (EC 2. 6. 1. 2.), amonyum sülfat kesiti, Sephadex G - 200 (Şekil : 1) ve DEAE. Sephadex A - 25 (Şekil : 2) kolon kromatografileri ile % 5 verimle 71 kez saflaştırıldı. Enzimin en aktif olduğu pH aralıkları 7.5 - 8.0 olarak bulundu (Şekil : 3)

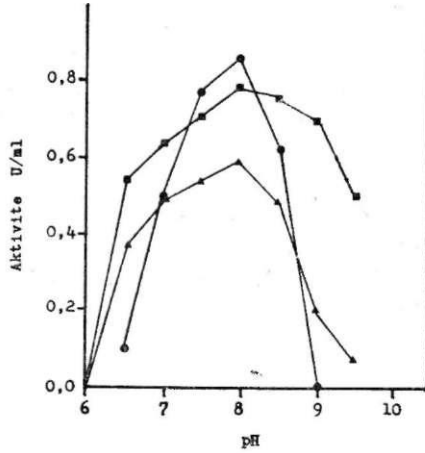


Şek. — 1 : Sephadex G - 200 kolon kromatografisi elusyon profili. Kolona uygulanan örnek 0.05 M Tris-HCl, 0.1 M KCl, 10^{-3} M 2 - merkпто etanol pH=7.8 ile elüe edilerek 2 ml fraksiyonlar halinde toplandı. Her tüpte etkinlik (•—•) ve 280 nm'de absorbans (0—0) ölçüldü.

Koyun Karaciğer Stitozolik Alanin



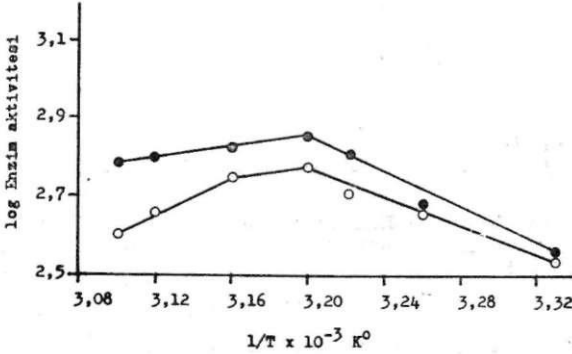
Şek. — 2 : DEAE Sephadex A - 25 kolon kromatograf isi profili. Örnek kolona uygulandıktan sonra kolon başlangıç tamponu ile yıkandı. 0.05 M Tris-HCl, 0.5 M KCl, 10^{-2} M 2 -merkapto etanol pH=7.8 gradienti uygulanarak 4 ml fraksiyonlar halinde toplanan örneğin her tüpte etkinliği (●—●) ve 280 nm'de absorbanısı (O—O) ölçüldü.



Şek. — 3 : Farklı tampon ve pH değerlerinde GPT aktivite eğrileri. (Δ—Δ) Tris, (■—■) Fosfait, (●—●) Bikarbonat tamponları.

Gazanfer BİNGÖL, Şeyma ÖĞÜT

Isı denaturasyonu deneyi yapılan enzimin 38°C den başlayarak ölçüm süresi içinde aktivitesinde düşme gözlemlendi. Aktivite değerleri sıcaklık derecelerine karşı grafiğe geçirildiğinde 38°C de denaturasyonun başladığı görüldü (Şekil : 4). 0.01 M L - prolin ile deney tekrarlanarak aynı sıcaklık derecelerinde aktivitenin değişmesi gözlemlendi. L - prolinin denaturasyonu geciktirdiği görüldü.



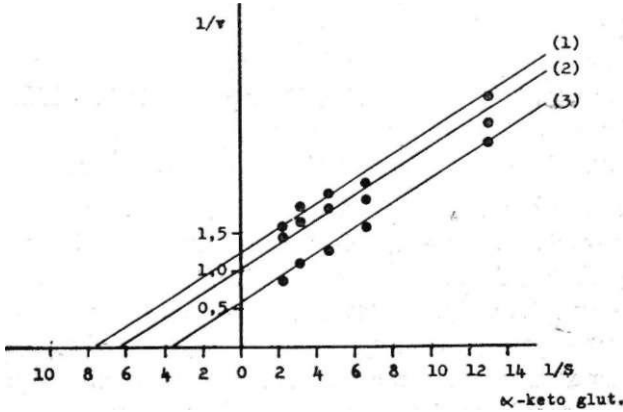
Şek. — 4 : Sitolitik GPT enziminin Arrhenius eğrisi.

(○—○) Standart şartlarda,

(●—●) 0.01 M L-prolin varlığında.

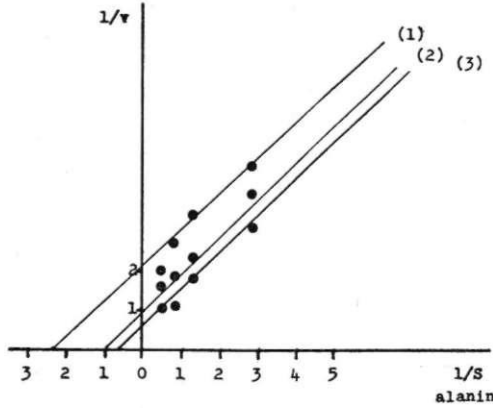
Metal iyonları varlığında yapılan deneylerde ise en düşük % aktivite Cu⁺ ve Li⁺ ile, en yüksek % aktivite Ca⁺ ile elde edildi.

Km değerleri alanin için 1.66 mM, α -keto glutarat için 0.33 mM olarak bulundu (Şekil : 5), (Şekil : 6).



Şek. — 5 : Alaninin Km değerinin Lineweaver.Burk eğrisi ile saptanması. Alanin konsantrasyonu sabit, α -keto glutarat konsantrasyonu değişken olarak alınmıştır.

Koyun Karaciğer Stitozolik Alanin



Şek. — 6 : α -keto glutaratın Km değerinin Lineweaver-Burk eğrisi ile saptanması, α -keto glutarat konsantrasyonu sabit, alanin konsantrasyonu değişken olarak alınmıştır.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Alanin aminotransferaz enziminin özelliklerini incelemek amacı ile literatürde çok farklı tür ve dokuların seçildiği görülmektedir. Enzim çeşitli tür ve dokularda farklı oranlarda bulunmaktadır (5, 15).

Koyun karaciğeri GPT enzimi diğer türlerin enzimlerinden bazı yönleri ile ayrılmakta, bazı özellikleri ise - molekül ağırlığı hariç tutulursa - özellikle rat karaciğeri sitozolik enzimine benzemektedir. Çalışmamızda kullanılan taze koyun karaciğerinde ortalama 1.6 - 2.3 U/ml enzim etkinliği bulunmuştur. Tris - HCl, fosfat ve bikarbonat tamponlarla yapılan etkinlik deneylerinde enzim için optimum pH 7.5 - 8.0 olarak saptanmıştır. Deneylerde Tris - HCl tamponun tercih edilmesi aktivite tayininde kullanılan NADH'ın bu tamponda daha dayanıklı olmasından ileri gelmektedir (16).

Isı denaturasyonu deneyleri sonucunda enzimin 38°C den başlayarak aktivitesini kaybettiği, L - prolinli ortamda ise denaturasyonun yavaşladığı görülmüştür (Şekil : 4). Segal - Matsuzawa (17) L - prolinin rat karaciğeri alanin aminotransferaz enzimini ısı denaturasyonuna karşı koruduğunu belirtmişlerdir. Bu özellik koyun karaciğeri enzimi için de geçerli olmaktadır. L-prolin muhtemelen enzimle bağlanarak, ısı karşısında protein bağlarının kopmasını önlemekte ve denaturasyonu geciktirmektedir. Jung ve Egger'e göre

Gazanfer BİNGÖL, Şeyma ÖĞÜT

(18), serum alanin aminotransferaz enziminin Arrhenius eğrisi 27 - 30°C'de kırılma göstermektedir. Bu konuda yapılmış değişik araştırmalar vardır (18, 20). Çalışmamızda Arrhenius eğrisi 30°C de kırılma göstermiştir.

Metal iyonlarının enzimatik aktiviteye etkilerini inceleyen De Rosa-Swick (5), en çok Mg^{2+} , en az Cu^{2+} ile % etkinlik elde etmişlerdir. Çalışmamızda en çok Ca^{2+} ile etkinliğin korunduğu gözlenmiştir. İki değerli bir metal olarak Ca, Mg gibi etkinliği korumaktadır.

Alanin aminotransferaz enzimi ping-pong mekanizması ile çalışmaktadır. Enzimin etki ettiği iki substrata olan ilgisi birbirinden farklıdır. Buna göre alanin ve α -keto glutarat için farklı Km değerleri elde edilmektedir. Km değeri substratın hücresel seviyesi hakkında fikir verir. Ayrıca farklı organizmaların, dokuların veya gelişmenin farklı basamaklarında aynı doku enzimlerinin birbiri ile kıyaslanmasında önemlidir. Farklı bileşiklerin Km üzerine olan etkileri ölçülerek enzimatik aktivitenin inhibisyonu ve bu inhibisyonun tipi aydınlatılabilir. GPT enzimi için literatürde bulunan çeşitli türlere ait Km değerleri birbirinden farklıdır (Tablo : 1). Genel olarak ileri tepkimede α -keto glutarat için bulunan Km değerleri alanin için bulunan değerlerden daha küçüktür. Bu da enzimin α -keto glutarata olan ilgisinin alanine göre daha fazla olmasından ileri gelmektedir. Çalışmamızda alanin için 1.66 mM, (Şekil : 5), α -keto glutarat için 0.33 mM (Şekil : 6) Km değerleri bulunmuştur, önceki çalışmalara göre her iki substrat için de enzimde tek bir bağlanma yeri vardır (21, 22).

Tablo : 1 (EC 2.6.1.2) için çeşitli kaynaklardan alınan Michaelis sabiteleri

Tür	Substrat	Km (M)
Domuz Kalbi sGPT	L - ala	$2,8 \times 10^{-2}$
	α keto glu.	$4,0 \times 10^{-4}$
	pirüvat	$3,0 \times 10^{-4}$
	L - glut.	$2,5 \times 10^{-2}$

Koyun Karaciğer Stitozolik Alanin

Sığır Kalbi	L - ala	1,0 x 10 ⁻³
s G P T	α - keto glu.	1,2 x 10 ⁻⁴
	pirüvat	2,3 x 10 ⁻⁴
	L - glut.	8,1 x 10 ⁻³
Rat Karaciğeri		
s G P T	L - ala	4,2 x 10 ⁻³
	α - keto glu.	1,1 x 10 ⁻³
	pirüvat	9,0 x 10 ⁻⁴
	L - glut.	1,5 x 10 ⁻²
Domuz Karaciğeri		
m G P T	L - ala	1,9 x 10 ⁻³
	α - keto glu.	0,42x 10 ⁻³
Rat Beyni		
s G P T	L - ala	9,1 x 10 ⁻³
	α - keto glu.	0,71x 10 ⁻³
m G P T	L - ala	6,1 x 10 ⁻³
	α - keto glu.	0,54x 10 ⁻³
Rat Karaciğeri		
m G P T	L - ala	6,1 x 10 ⁻³
	α - keto glu.	0,5 x 10 ⁻³

ÖZET

Bu çalışmada alanin aminotransferaz enzimi (EG 2. 6. 1. 2.) taze koyun karaciğerinden elde edilerek optimum pH değerleri 7.5 - 8.0 olarak bulundu.

Isı ile bozunma deneyleri 38°C den başlayarak Arrhenius eğrisinin kırıldığını, ısı ile denaturasyonun 10⁻³ M L - prolinle geciktirildiğini gösterdi. Km değerleri alanin için 1.66 mM, α - keto glutarat için 0.33 mM olarak bulundu.

Metal iyonlarından Ca²⁺ un 10⁻³ M konsantrasyonda aktiviteyi koruduğu, Cu²⁺ nin ise aktiviteyi düşürdüğü gözlemlendi.

SUMMARY

In this study alanine aminotransferase enzyme (EC 2. 6. 1. 2.) was obtained from fresh sheep liver, and its optimum pH value was found between 7.5 and 8.0.

The denaturation of the enzyme commenced at 38°C, and a break was observed in the Arrhenius plot at this temperature. Heat denaturation was delayed by 10^{-2} M L - prolin.

Km values were determined 1.66 mM for alanine, and 0.33 mM for a - keto glutarate.

10^{-3} M of Ca^{2+} ion was found to be effective in the preservation of the present activity, but Cu^{2+} ion at the same concentration decreased nearly all the enzyme activity.

LİTERATÜR

1. Saier M. H., Jenkins W. T., *J. Biol Chem.*, 242 : 1, 91 (1967)
2. Gatehouse P. W., Hopper S., Segal H. L., *J. Biol Chem.*, 242 : 10, 2319 (1967)
3. Matsuzawa T., Segal H. L., *J. Biol. Chem.*, 242 : 22, 5929 (1968).
4. Herzfeld A., Rosenoer V. M., Kapers M., *Pediatr. Res.*, 10, 960 (1976).
5. De Rosa G., Swick R. W., *J. Biol Chem.*, 250 : 20, 7961 (1975).
6. Katunuma N., Mikumo K., Matsuda M., Okada M., *J. Vitaminol.*, 8 : 68 (1962).
7. Swick R. W., Barnstein P. L., Stange J. L., *J. Biol Chem.* 240 : 8, 3334 (1965).
8. Abdul M. M., O'brien P. J., *Arch. Biochem. Biophys.* 167 : 193, 202 (1975).
9. Raison J. K., Thomson W. W., *Arch. Biochem. Biophys.*, 142 : 83, (1971).
10. Hopper S., Segal H. L., *Arch. Biochem. Biophys.* 105, 501 (1964).
11. Welch S., *Humangenetik* 30 : 237, (1975).
12. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A, L., Randell R. J., *J- Biol Chem*, 193, 256, (1951).
13. *Methods in Enzymology* Vol. III, P. 451 Academic Press (1957).
14. Segal I. H., *Enzyme kinetics, behavior and analysis of rapid equilibrium and steady-state enzyme systems.* J. Wiley Inc. (1975).
15. Cohen Philip P., *Fed. Proc.*, I : 2, 273 (1942).
16. Hafkenscheid C. M., Dijt C. M., *J. Clin. Chem. Biochem.* 15, 519 (1977).
17. Segal H. L., Abraham G. J., Matsuzawa T., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 30 : 1, 63, (1968).
18. Jung. K., Egger E., *Clinica Chimica Acta*, 64 : 329, (1975).
19. Kumamoto J., Raison J. K., Lyons J., *J. Theor. Biol.* 31, 47 (1971).
20. Lenaz G., Sechi G., Bertoli E., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 49, 2, 536 (1972).
21. Green D. E., Leloir L. F., Nocito V., *J. Biol. Chem.*, 161, 550 (1945).
22. Saier M. H., Jenkins W. T., *J. Biol Chem.*, 242 : 1, 101, (1967).