

JURİ ÜYELERİ

Doç.Dr.Nazan DEMİR

N. Demir

Yrd.Doç.Dr.Yaşar DEMİR

Y. Demir

Yrd.Doç.Dr.Hasan ÖZDEMİR

H. Özdemir

08.02.2001 tarihinde 23/186 kararla kurulan jürimiz iş bu Y.Lisans
tezini 19.09.2001 tarihinde kabul etmiştir.

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

ANTİK İNSAN VE KUZEYDOĞU ANADOLU STEP FİLİNİN (ELEPHAS
TROGONOTHERİİ-MAMUT) KEMİKLERİNDE ALKALEN FOSFATAZ
ENZİMİNİN ARANMASI VE TANIMLANMASI

105331

Safinur YILDIRIM

Yönetici: Doç. Dr. Nazan DEMİR

Yüksek Lisans Tezi

105331

ÖZET

Bu çalışmada, alkalen fosfataz enzimi (AP) antik insan kemiklerinden total olarak ve antik fil kemiğinden bağlanma şekillerine göre dış periferel, sitozolik, iç periferel ve integral olmak üzere dört basamakta ayrı, ayrı saflaştırıldı ve karakterize edildi.

3000 yıllık antik insan kemiklerinden total olarak alkalen fosfataz enzimi jel filtrasyon ve iyon değişim kromatografisi kullanılarak saflaştırıldı. Daha sonra yaşı yaklaşık olarak 300.000 ile 800.000 yıl arasında tahmin edilen Kuzeydoğu Anadolu Step Fil'inin (*Elephas Trogontherii*) kemiklerinden bağlanma şekillerine göre dört basamakta alkalen fosfataz izoenzimleri iyon değişim kromatografisi ile saflaştırıldı. Bu izoenzimlerin aktiviteleri substrat olarak p-nitrofenilfosfat kullanılarak tayin edildi. Saflaştırılan AP izoenzimlerinin optimum pH'ları ve optimum sıcaklıkları belirlendi. Ca^{+2} iyonunun ve tonocalsinin (kemik erimesi hastalığının tedavisinde kullanılan bir ilaç) AP aktivitesi üzerine etkisi araştırıldı. Bütün izoenzimlerin molekül ağırlıkları jel filtrasyon kromatografisi ile belirlendi. Ayrıca Lineweaver-Burk grafikleri metodu kullanılarak bu AP izoenzimlerinin V_{max} ve K_m değerleri bulundu.

Elde edilen bu sonuçlardan yararlanılarak antik insan kemiğinden AP enzimi ve antik fil kemiğinden elde edilen dış periferel, sitozolik, iç periferel ve integral AP izoenzimleri saflaştırılıp, karakterize edildi.

SUMMARY

Human bone alkaline phosphatase was isolated and its characteristic features were determined. In according to bonding forms, AP enzymes were separately purified and characterized at four steps from steps elephant (*Elephas Trogontherii*) as outer peripheral, inner peripheral, integral and cytosolic.

Using gel filtration and anion exchange chromatography purified human bone alkaline phosphatase enzyme that aged 3000 years. 0,3-0,8 million years aged elephant bone alkaline phosphatase isoenzymes was purified by using anion exchange chromatography. The activity measurement of these izoenzymes was used by using p-nitrophenylphosphate as substrate. The optimum pH and the optimum temperatures of AP izoenzymes were determined.

The behaviors of AP against Ca^{+2} and tonocalsin has been investigated. The molecular weight of all enzymes was determinated by using gel filtration . Also V_{max} and K_M values of purified isoenzymes from human and elephant bone were found by using Lineweaver-Burk method.

Human bone AP and elephant bone AP izoenzymes were characterized based on the obtained results.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışma, Doç. Dr. Nazan DEMİR yöneticiliğinde gerçekleştirilmiştir.

Her an bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, bana her türlü desteği sağlayan ve öğrencisi olmaktan gurur duyduğum saygıdeğer hocam Doç. Dr. Nazan DEMİR'e;

Çalışmamın bütün safhalarında bölümün bütün imkanlarını benden esirgemeyen Dekanımız Sayın Prof. Dr. Sebahattin TÜZEMEN'e, Kimya Bölümü Başkanı Sayın Hasan SEÇEN'e, Kimya Bölümü Biyokimya Anabilimdalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU'na;

Tezimin deneysel ve yazım aşamasında bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım ve benden yardımlarını esirgemeyen sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Yaşar DEMİR'e;

İlgi yardım ve manevi desteğini gördüğüm Arş. Gör. Hayrunnisa NADAROĞLU ve Fatma COŞKUN'a

Başta Biyokimya Araştırma Grubu olmak üzere, tüm hocalarıma, arkadaşlarıma, anneme, kız kardeşime ve katkıları olan herkese içten teşekkürlerimi sunarım,

Ağustos 2001

Safinur YILDIRIM

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	I
SUMMARY	II
TEŞEKKÜR	III
KISALTMALAR VE SİMGELER	VII
1. GİRİŞ	1
2. MATERYAL ve YÖNTEMLER	22
2.1. Kullanılan Madde ve Malzemeler	22
2.2. Yararlanılan Alet ve Cihazlar	22
2.3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması	23
2.4. Kullanılan Çözücülerin Saflaştırılması	24
2.5. Yöntemler	25
2.5.1. Protein Tayini	25
2.5.1.a. Kantitatif Protein Tayini	25
2.5.1.b.Coomassie-Blue Yöntemiyle Protein Tayini	25
2.5.2. Alkalen Fosfataz Aktivitesi Tayini	26
2.5.3. TEAE-selüloz İyon Değişim Kolonunun Hazırlanması	27
2.5.4. Sephadex G-200 Jel Filtrasyon Kolonunun Hazırlanması	27
2.5.5. Antik İnsan Kemiklerinden Total Olarak Alkalen Fosfataz Enziminin Saflaştırılması	27
2.5.5.a. Antik İnsan Kemiklerinin Temin Edilmesi ve Homojenatın Hazırlanması	27

2.5.5.b. Antik İnsan Kemiklerinden Elde Edilen Homojenatın Sephadex G-200 Jel Filtrasyon Kolonuna Yüklenmesi ve Elüsyon Alınması	28
2.5.5.c. Jel Filtrasyon Kolonundan Elde Edilen Enzim Çözeltilisinin TEAE-selüloz İyon Değişim Kolonuna Yüklenmesi ve Elüsyon Alınması	28
2.5.6. Antik Fil Kemiğinden Alkalen Fosfataz İzoenzimlerinin Ayı Ayrı Saflaştırılması	29
2.5.6.a. Antik Fil Kemiğinin Temin Edilmesi ve Homojenatların Hazırlanması.....	29
2.5.6.b. Antik Fil Kemiğinden Elde Edilen Homojenatların Sephadex G-200 Jel Filtrasyon Kolonuna Yüklenmesi ve Elüsyon Alınması	31
2.5.6.c. Jel Filtrasyon Kolonundan Elde Edilen Enzim Çözeltililerinin TEAE-selüloz İyon Değişim Kolonuna Yüklenmesi ve Elüsyon Alınması	32
2.5.7. Sodyumdodesilsülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrez ile Enzim Saflığının Kontrolü	35
2.5.8. Optimum pH'nın Belirlenmesi	36
2.5.9. Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi	37
2.5.10. Jel Filtrasyon Kromatografisi ile Molekül Ağırlığının Tayini	37
2.5.11. V_{maz} ve K_M Değerlerinin Belirlenmesi	38
2.5.12. Antik İnsan Kemiklerinden Saflaştırılan Total Alkalen Fosfataz Enziminin Aktivitesi ve Antik Fil Kemiğinden Bağlanma Şekillerine Göre Dış Periferik, Sitosolik, İç Periferik ve İntegral Alkalen Fosfataz İzoenzimleri Aktivitesi Üzerine Ca^{+2} İyonunun ve Tonocalsinin Etkisinin Araştırılması	39
3. SONUÇLAR	41
3.1. Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Eğri	41
3.2. Antik İnsan Kemiklerinden Total Olarak Saflaştırılan Alkalen Fosfataz Enziminin Sephadex G-200 Jel Filtrasyon ve TEAE-Selüloz İyon Değişim Kromatografisi ile Saflaştırma Sonuçları	41

3.3. Antik Fil Kemiklerinden Dış Periferal, Sitozolik, İç Periferal ve İntegral Alkalen Fosfataz Enzimlerinin Sephadex G-200 Jel Filtrasyon ve TEAE-Selüloz İyon Değişim Kromatografisi ile Saflaştırma Sonuçları	46
3.4. Antik İnsan Kemiklerinden Saflaştırılan Total Alkalen Fosfataz ve Antik Fil Kemiğinden Saflaştırılan Dış Periferal, Sitozolik, İç Periferal ve İntegral Alkalen Fosfataz Enzimlerinin SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi Sonuçları	60
3.5. Antik İnsan Kemiklerinden Saflaştırılan Total Alkalen Fosfataz ve Antik Fil Kemiğinden Saflaştırılan Dış Periferal, Sitozolik, İç Periferal ve İntegral Alkalen Fosfataz Enzimlerinin Optimum pH Sonuçları	63
3.6. Optimum sıcaklık sonuçları	66
3.7. Antik İnsan Kemiklerinden Saflaştırılan Total Alkalen Fosfataz ve Antik Fil Kemiğinden Saflaştırılan Dış Periferal, Sitozolik, İç Periferal ve İntegral Alkalen Fosfataz Enzimlerinin Aktivitesi Üzerine Ca^{+2} ve Tonocalinin Etkisi	69
3.8. V_{maz} ve K_M Değerleri Sonuçları	74
3.9. Jel Filtrasyon Kromatografisi Sonuçları	75
TARTIŞMA	78
KAYNAKLAR	83

KISALTMALAR VE SİMGELER

AP	:	Alkalen fosfataz
ATPaz	:	Adenozin trifosfataz
D	:	Dalton
E.C.	:	Enzim kod numarası
GCAP	:	Germ hücreleri alkalen fosfatazı
IAP	:	Bağırsak alkalen fosfatazı
MU	:	Mili ünite
O.D.	:	Optik dansite
PER	:	Amonyum persülfat
PLAP	:	Plasenta alkalen fosfatazı
SDS	:	Sodyumdodesilsülfat
TCA	:	Triclor asetik asit
TEAE	:	Trietilaminoetil
TEMED	:	N,N,N',N' tetrametiletillen diamin
TNAP	:	Dokuya nonspesifik alkalen fosfataz
Tris	:	Trihidroksimetil aminometan
TSAP	:	Dokuya spesifik alkalen fosfataz

1. GİRİŞ

Enzimler, biyolojik katalizörler veya kataliz etkisini gösteren proteinler olarak adlandırılmaktadırlar. Enzimler hücre içerisinde kimyasal reaksiyonları hücrenin gereksinimlerine uygun bir şekilde katalizlemektedirler. Yapılarındaki aminoasitlerin sıralanışı ve buna bağlı olarak enzimlerin kazandığı üç boyutlu yapı, enzimlerin kataliz görevini yapmalarını sağlayan en önemli etkidir.

Biyolojik sistemlerdeki kimyasal reaksiyonların tümünde reaksiyona katılan bileşikler ile ürünleri birbirinden ayıran bir enerji engeli bulunmaktadır. Bu şekilde, reaksiyonların kendiliğinden ve kontrolsüz gerçekleşmesi önlenmektedir. Enzimler enerji açısından gerçekleşmelerine engel olmayan reaksiyonları, metabolik yollar oluşturacak şekilde yönlendirmektedirler. Katalizledikleri reaksiyonlar sırasında değişikliğe uğrayan enzimler reaksiyonların bitiminde tekrar eski şekillerine geri dönmektedirler. Yalnızca bir tek enzim molekülü pek çok sayıda substratın ürüne dönüşmesini sağlayabilmektedir. Enzimler, hücresel reaksiyonların hızını hücrenin gereksinimlerine göre ayarlamaktadırlar. Belirli reaksiyonların organeller içerisinde diğerlerinden etkilenmeden aynı anda gerçekleşebilmesi için pek çok enzimin hücre içindeki yerleşimi, metabolik olayların özelliğine göre düzenlenmiştir¹.

Enzimlerin katalizlenen reaksiyonun aktivasyon enerjisini düşürme ve böylece dengenin yerleşmesini çabuklaştırma özelliğine sahip oldukları termodinamik olarak gözlenmiştir. Bir enzim-substrat kompleksi olan (ES) ve bundan, asıl reaksiyon sonucu daha sonra Enzim+Ürün'e parçalanacak olan, enzim ve üründen ibaret bir kompleks (EP) oluşur. Böylece enzim rejenere edilmiş olur ve substrat ile tekrar reaksiyon verebilir².

Enzimatik olarak katalizlenen reaksiyon inorganik bir katalizör ile veya katalizörsüz olarak en çok yerleşebilen ve denge sabiti K vasıtasıyla karakterize eden bir denge durumuna ulaşınca kadar devam eder^{2,3}.

Çok yüksek katalitik verimliliği bulunan enzimlerin katalizlediği reaksiyonlar, katalizlenmeyen reaksiyonlara göre 10^8 - 10^{20} kez daha hızlı sonuçlanmaktadır. Enzim mole-

külü tarafından bir saniyede ürüne çevrilen substrat molekülü sayısı, turnover sayısı olarak adlandırılmaktadır.

Enzimler yardımıyla meydana gelen reaksiyonlar insanlar tarafından uzun süredir kimya endüstrisinde, gıda mühendisliğinde ve tarım alanında çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır. Şarap ekmek, peynir, yoğurt gibi içecek ve yiyeceklerin yapımında, enzimler tarafından katalizlenen reaksiyonlardan yararlanılmaktadır. Ayrıca son yıllarda hastalıkların tanı ve tedavisinde enzimlerin önemi giderek artmaktadır¹.

Enzimlerin belirli bileşik ve benzer bileşik grupları üzerine etkili olup, başka bileşiklerle reaksiyon vermemesine enzim spesifikliği denir. Bazı enzimler son derece dar bir spesifiklik aralığına sahipken, özellikle grup reaksiyonları katalizleyen enzimler daha geniş bir spesifiklik aralığına sahiptirler. Elde edilmek istenilen ürüne göre reaksiyonu spesifik olarak katalizleyecek uygun enzimin belirlenmesi ve uygun enzimi % 100 saf olarak elde etmeye yarıyacak uygun bir metodun bilinmesi gerekmektedir⁴.

Katalitik aktivite gösterebilmeleri için bazı enzimlerin protein yapısında olmaları yeterli olmaktadır. Ancak, bir çok enzim katalitik etki gösterebilmek için kofaktör olarak bilinen ve protein yapısında olmayan moleküllere gereksinim duymaktadır. Kofaktör bir metal iyonu (Zn^{+2} , Fe^{+2} , Mg^{+2}) veya koenzim olarak adlandırılan bir organik molekül (NAD^+ , FAD, koenzim A) olabilmektedir. Enzimlerin bir kısmı aktivite gösterebilmek için koenzime ve metal iyonlarına birlikte gereksinim duyabilmektedir. Proteinlerin denaturasyonlarına neden olan koşullardan koenzimler etkilenmektedirler¹. Yapısında kofaktör olan enzime haloenzim denmektedir. Kofaktörü kendisinden uzaklaştırılan enzim, aktivitesini kaybeder. Enzimin yalnız protein kısmını ihtiva eden bu yapıya apoenzim adı verilir.

Bir çözelti veya doku ekstraktı içindeki enzim miktarı, enzimin katalitik etkisinden yararlanarak bulunur ve enzim ünitesi cinsinden verilir. Enzim ünitesi için bütün enzimleri kapsayacak bir tanım yoktur. Genellikle, bir enzim ünitesi, $25^{\circ}C$ 'de ve optimum şartlarda 1 μ mol substratı 1 dakikada ürüne dönüştüren enzim miktarı olarak tanımlanır. 1 mg

protein başına düşen enzim ünitesi, spesifik aktivite olarak tarif edilir ve bu da saflığın bir ölçüsüdür^{5,6}.

Enzim aktivitesine etki eden faktörler;

1. Enzim konsantrasyonu,
2. pH,
3. Sıcaklık,
4. Substrat konsantrasyonu,
5. İyonik şiddet,
6. İnhibitör ve aktivatörler.

Son olarak belirtilen inhibitörler, enzimli reaksiyonların hızlarını azaltan veya tamamen durduran bileşiklerdir.

Biyokimya bilim alanında, günümüze kadar en çok araştırma yapılan konu enzimlerdir. Enzimlerden sağlık alanında yararlanılması klinik enzimoloji adı verilen yeni bir sahanın doğmasına yol açmıştır. Klinik teşhis amacıyla kullanılan birçok analitik metod da enzimler yer almaktadır. Aynı zamanda değişik dokular, serum, beyin, omurilik sıvısı ve diğer vücut sıvılarında enzim seviyelerinin ölçülmesi ile birçok hastalıklar hakkında önemli bilgiler elde edilmektedir⁷.

Alkalen fosfatazın bulunuşu ve izoenzimleri

Alkalen fosfataz (AP) (E.C: 3.1.3.1., ortofosforikmonoester fosfohidrolaz alkali optimum) Zn^{+2} iyonu ihtiva eden bir metaloenzim olup fosfatmonoesterlerinin hidrolizini katalizler^{8, 9}.

Fosfatazlar ilk olarak 20. yy. başlarında bitki ve hayvan hücrelerinde yapılan çalışmalarda fosfat esterlerini fosforik aside parçalayan bir enzim olarak bulunmuştur^{10, 11}. Fosfatazlar üç ana grup altında toplanır;

1. Kemik ve böbreklerde^{12, 13}, bağırsak mukozasında¹⁴ ve sütte¹⁵ bulunup, pH: 9-10 arasında optimum aktivite gösteren fosfatazlar,
2. Eritrositlerde bulunup, pH: 6-7 arasında optimum aktivite gösteren fosfatazlar^{16, 17},
3. Ciğer, dalak ve böbrek gibi hayvan dokularında^{18, 19}, bitki ve mantarlarda^{20, 21} bulunup, pH: 4,5-5,5 ve pH: 3-4 arasında optimum aktivite gösteren fosfatazlar.

Alkalen fosfataz ile ilgili ilk review 1950'de Roche tarafından yazılmıştır^{22, 23}. Alkalen fosfatazlar ilk olarak 1923'de kemik ve böbrekten izole edilmiştir¹². Nonspesifik alkalen fosfatazın çok yüksek saflıkta preparatları hazırlanarak bu preparatlarda enzimlerin bir takım fizikokimyasal özellikleri araştırılmıştır^{24, 22, 25}. Bu çalışmaların bir sonucu olarak böbrek alkalen fosfatazının prostetik grubunun Zn^{+2} metal iyonu olduğu bulunmuştur²⁶. Aşağıda tanımlanan sentetik aktivitelere ilaveten, nonspesifik alkalen fosfatazların fosfotransferaz olarak görev yaptığı da saptanmıştır²⁷.

Tablo 1. 1. Çeşitli fosfat esterlerinin üzerine E. Coli alkale fosfatazının aktivitesi²⁵.

Fosfat Esterleri	Nispi reaksiyon hızı
p-Nitrofenilfosfat	1, 0
Na-β-gliserolfosfat	0, 9
Glukoz-1-fosfat	0, 9
Adenozin-3'-fosfat	1, 0
Adenozin-3'-fosfat	0, 8
Sitidin fosfat	1, 2
Guanozin fosfat	1, 0
Uridin fosfat	1, 3
Riboflavin-5'- fosfat	0, 7
L-Histidinol fosfat	0, 9
Kreatin fosfat	0
Adenozin trifosfat	0
Na pirofosfat	0

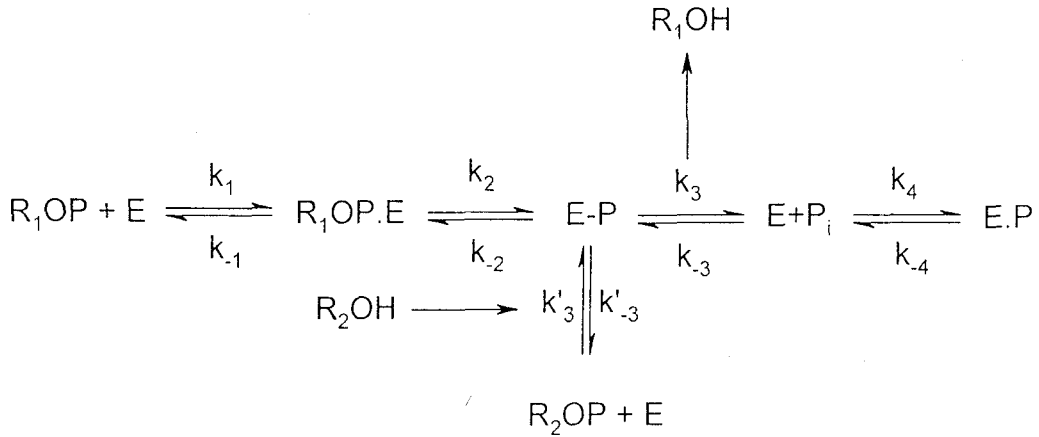
Çeşitli memeli hayvan dokularından elde edilmesinin yanısıra prokaryotik kaynaklardan da izole edilmiştir. Hepsinin (II) metaloenzim olduğu görülmüştür.

Tablo 1. 2. Ökaryotik ve prokaryotik kaynaklardan izole edilen alkalen fosfatazların izoenzimleri ve bunların molekül ağırlıkları.

	Kaynaklar	Molekül ağırlıkları (D)	Literatürler
Ökaryotik	İnsan plasenta	125.000 D	28, 29
	İnsan karaciğer	136.000 D	30
	Sığır kemik	216.000 D	31
	İnsan kemik	200.000 D	32
	Sığır bağırsak	138.000 D	33
	Sığır böbrek	172.000 D	34
	Fare karaciğer	154.000 D	35
Prokaryotik	E. Coli	98.000 D	36, 37
	B. Subtilis	100.000 D	38
	B. Lichenformis	121.000 D	39
	M. Sodonensis	80.000 D	40

Katalitik Özellikleri

Alkalen fosfatazlar doğada geniş bir şekilde dağılmıştır.



Şekil 1. 1. Şekilde gösterildiği gibi fosfat monoesterinin hidrolizini katalizler⁸.

Alkalen fosfataz R'nin kimyasal doğası ve büyüklüğü ne olursa olsun, ROP, fosfatmonoesterlerini benzer oranlarda hidrolizlendiğinden dolayı bir nonspesifik fosfomonoesterazdır⁴¹. Substratın alkolik veya fenolik kısmı için spesifik bir bağlanma bölgesi yoktur. Keza, ayrılan grubun pK_a 'sı birbirinden farklı olan altı substratla (örneğin; metil fosfattan 2, 4-p-nitrofenilfosfata kadar) yapılan deneylerde, enzimatik hidroliz oranında çok az bir değişme olmuştur. Yavaş basamak alkol veya fenolün kopmasını takip eden basamak olduğu tespit edilmiştir. Asidik pH'da farklı pK_a değerlerine sahip ayrılan gruplar için ölçümler yapılarak, fosforilasyonun pK_a değerine bağımlı olduğu gözlenmiştir. Ayrılan grubun pK_a 'sındaki çok küçük bir değişme bile, örneğin 2, 4-dinitrofenilfosfattan p-nitrofenilfosfata, fosforilasyon oranında (k_2) önemli bir değişme meydana getirmiştir⁴².

Enzim P-S bağına P-O bağı kadar hızlı hidrolizler, fakat o-fosforitiyatı. ROPS'yi, 10^3 kat daha yavaş hidrolizler. Bu da nükleofilik mekanizmayı desteklediğini göstermiştir⁴³.⁴⁴. P-N bağına P-O bağından çok az bir farkla daha yavaş hidrolizler⁴⁵. P-C bağına hidrolizini katalizlemez. Fosfonat dianyonlarının enzime fosfat dianyonlarından daha zayıf bağlanmasına rağmen, fosfonat dianyonları enzimin yarı yarışmalı inhibitörüdür. Bu enzim için reaksiyon yolu Şekil 1'de verilmiştir. Bu reaksiyonun son iki basamağı dengede olup, inorganik fosfat E-P formu için substrat olarak kullanılabilir.

Alkalen Fosfatazın İnhibitörleri

Alkalen fosfataz Mg^{+2} iyonu tarafından uyarılır^{46, 47}. Aktif bölgede magnezyum iyonunun bağlanma bölgesi çinko iyonu bağlanma bölgesinden farklıdır. Magnezyum iyonu defosforilasyon prosesini uyarmak için enzim üzerinde allosterik bir etkiye sahiptir. Alkalen fosfatazın aktif bölgesinde Mg^{+2} iyonunun bağlanma bölgesine Zn^{+2} iyonunun afinitesi daha yüksektir. Ortamda Mg^{+2} iyonu düşük konsantrasyonda bulunursa, Mg^{+2} iyonu bağlanma bölgesine Zn^{+2} iyonu bağlanır ve bu da aktivite kaybına neden olur. Bundan dolayı aktivite tayinlerinde ortama belirli bir konsantrasyonda Mg^{+2} iyonu ilave edilmektedir.

Alkalen fosfatazin en yaygın inhibitörü EDTA gibi katyon şelatörleridir⁴⁸. Apo hali oluşturulan AP'nin kuaterner yapısında korformasyonel bir değişiklik olduğu gözlenmiştir⁴⁹.

Alkalen fosfataz aktivitesi çözücü cinsi ve iyonik şiddet gibi çevresel şartlardan etkilanmektedir⁵⁰.

Alkol, R_2OH reaksiyon karışımına yüksek konsantrasyonda katılırsa, ürün olan R_2OP 'in oluşması için akseptöre substrattan fosfat transfer eder⁴⁵. Bu transfer olayının gerçekleşmesinde OH (akseptör) taşıyan karbonun komşu karbonunda amino grubu bulunduran amino alkoller en fazla etkilidir; örneğin, aminometanol, tris tanponu (hidroksimetil amino metan)⁴¹. 1 M tris, pH: 8,0'de oksifosfat mono esterlerinin reaksiyon hızını üç ile dört kat kadar uyarılmıştır. Oluşan ürünlerin miktarları tespit edilirse, ürünlerin 3:1 ($R_1OH:P_i$) oranında oluşması, fosfat transferaz reaksiyonunun katkısının olduğu, böylece RO^- miktarının arttığı görülmüştür⁴⁵. O-fosforitiyatların reaksiyon hızı (60:1, R_1OH : fosfat tiyofosfat ürünlerin oranları) 1 M tris tamponu ile 15 ila 20 kat uyarılmıştır⁴⁴. Normal hidroliz reaksiyonlarında hızı sınırlayan basamak E. P ayrışma basamağı olarak bilindiğinden dolayı, muhtemelen E. R_2OP 'nin ayrışımı çok daha hızlı olur. Yarışan nükleofille reaksiyonun doymadığı gözlenmiştir. E-P hidrolizinde çözücünün yeri için yarışan akseptör alkoller olabilir⁸.

Genel olarak, ökaryotik alkalen fosfatazlar özellikle de insan alkalen fosfatazları bakteri alkalen fosfatazı ile ortak olmayan bir tane kinetik özellik göstermiştir. Ökaryotik alkalen fosfatazlar yarı yarışmalı mekanizma vasıtasıyla bazı aminoasitlerle stereospesifik olarak inhibe olmuşlardır. Diğer aminonsitlerden farklı olarak Trp, Leu, Phe yarı yarışmalı mekanizmayla dokuya spesifik alkalen fosfataz izoenzimlerini (TSAP) inhibe ettikleri bulunmuştur^{51, 52}. Bu inhibisyonlar stereospesifik olup, sadece ve L-izomerler inhibisyon etkisi göstermişlerdir. L-Homoarginin ise dokuya nonspesifik (TNAP) alkalen fosfatazların spesifik inhibitörüdür. Dokuya spesifik ve dokuya nonspesifik alkalen fosfatazı ayıran L-Fenilalanin ve L-Homoargininin bu özelliği AP izoenzimlerinin tanımlanması ve miktarının belirlenmesi amacıyla laboratuvarlarda kullanılmaktadır^{53, 54}.

Bağırsak, kemik, böbrek, dalak ve akciğerde bulunan alkalen fosfataz izoenzimlerinin aktivitesi üzerine L-ve D-Fenilalaninin etkisi araştırılmış ve sadece bağırsakta bulunan alkalen fosfataz izoenziminin L-Fenilalaninle inhibe olduğu gözlenmiştir^{51, 55}.

İnsan plasenta (PLAP), bağırsak (IAP) ve kemik ile karaciğerde (TNAP) bulunan alkalen fosfataz aktivitesi üzerine L-, D- Triptofan ve L-, D-Homoargininin etkisi araştırılmıştır. L-Triptofan sadece bağırsak ve plasenta alkalen fosfataz izoenzimleri üzerine etki ederken⁵⁶, L-Homoargininin kemik ve karaciğer alkalen fosfatazını inhibe ettiği görülmüştür⁵⁷.

L- ve D-Leu ile yapılan çalışmalarda ise L-Lösin plasental ve germ hücreleri alkalen fosfataz izoenzimlerinin aktivitesi üzerine etkili olduğu gözlenmiştir. L-Lösin germ hücreleri alkalen fosfatazını plasenta alkalen fosfatazından yaklaşık olarak 16-20 kat daha fazla inhibe etmiştir⁵⁸.

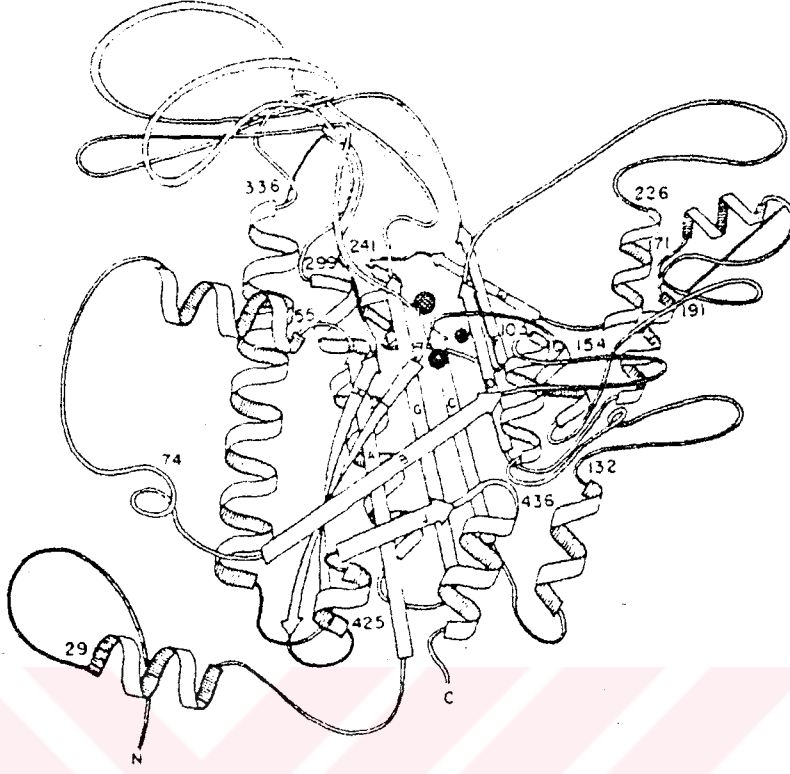
Plasental alkalen fosfataz (PLAP) ve germ hücreleri alkalen fosfatazı (GCAP) farklı iki gen tarafından kodlanır^{59, 60}. Bu iki izoenzimin sadece oniki aminoasit rezidüsü bir birinden farklı olup, immunokimyasal ve fiziksel özelliklerin temelinde birbirinden ayırd edilememişlerdir. Şu anda, GCAP ve PLAP'nin birbirinden ayrılması, tümörlerin iyi tanımlanmasında GCAP'nin artan öneminden dolayı önemlidir⁶¹.

Yakın zamanlarda, L-Leu ile GCAP'nin yarıyarışmalı inhibisyonunun en büyük belirleyicisi Gly 429 olduğu gösterilmiştir⁶². E. Coli molekülünde eşdeğeri olmayıp, sadece ökaryotik AP'lerde bulunmuştur. Gly 429'un (GCAP'de var olan) Glu 429 (PLAP'da var olan) ile yer değiştirilmesiyle mutantlarda oluşturulmuş ve bu mutantlarda konformasyonel bir değişikliğin olduğu görülmüştür⁶³. İkinci bir pozisyonda Ser 84, inhibitörlerin yan zincirlerinin stabilizasyonunu sağlamıştır⁶². Çok yakın zamanlarda, inhibitörün, karboksil ve α amino grupları vasıtasıyla Zn^{+2} metal iyonu (1) ile Arg 166'nın arasına fonksiyonel olarak girdiği tespit edilmiştir⁶⁴.

Elde edilen bu sonuçlarla L-Phe ve L-Leu ile PLAP ve GCAP'nin yarı yarışmalı inhibisyonunun moleküler modeli aşağıdaki gibi önerildi; fosforillenmiş substratın aktif

bölgeye bağlanmasını müteakip, Arg 166'nın guadinium grubu (yerleşmiş fosfata sokulan) L-Leu'sinin karboksilik grubuna yeniden yönelir ve bu şekilde aktif bölgede inhibitör stabilize olur. Glu 429 ile Gly 429'un yer değiştirmesi, L-Leu'ne ait yan zincirin yerleşmesi süresince sterik engel elimine edilir, böylece inhibitörün aktif bölgeye girilebilirliği artırılmış olur. Bu şekilde, L-Leu'sinin GCAP'yi PLAP'den 16 kat daha fazla inhibe etmesi açıklanmıştır. Sonuç olarak, L-Leu'sinin protonlanmamış amino grubu, fosfoenzim bağının hidrolizini engelleyerek aktif bölge Zn^{+2} metal iyon l'e doğru yönelir, bu şekilde aktif enzim moleküllerinin sayısı azaltılmış olur. Bu fenomen inhibisyonun yarıyarışmalı olduğunu tespit etmiştir⁶¹.

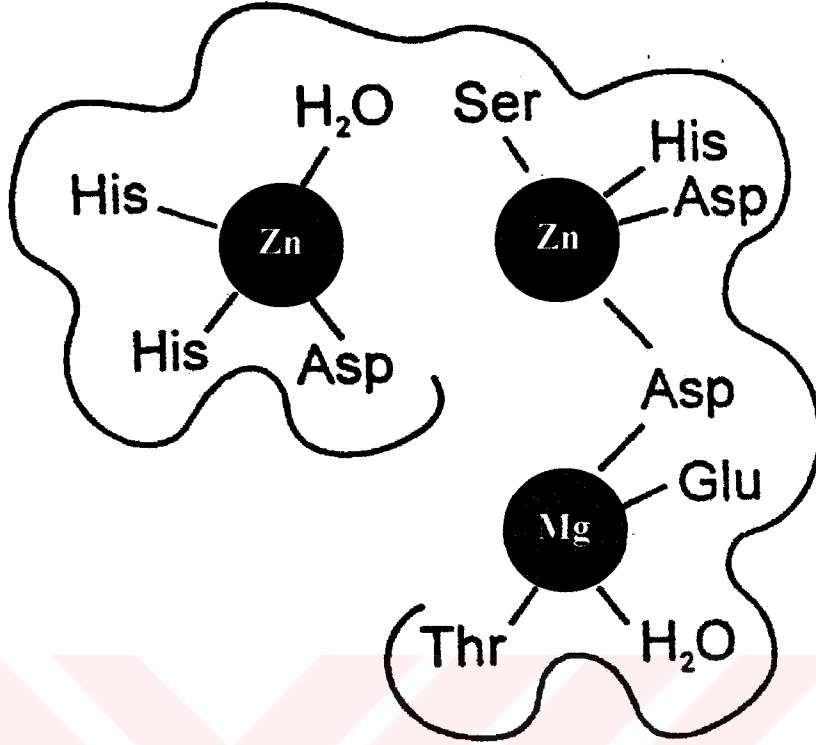




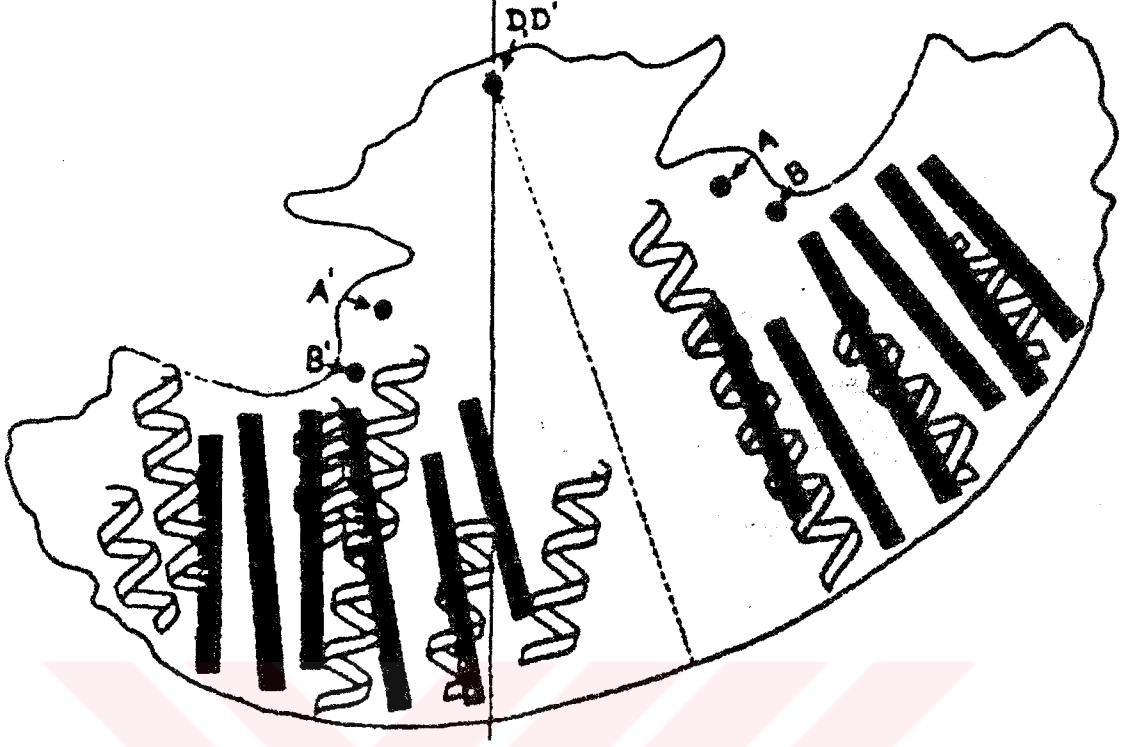
Şekil 1. 2. E. Coli alkaleen fosfatazin üç boyutlu yapısının şematik görüntüsü. Şeklin orta kısmında bulunan 3 siyah küre metal iyonlarının bağlanma bölgesidir. Bunlardan iki tanesi Zn^{+2} iyonu ve bir tanesi Mg^{+2} iyonunu temsil etmektedir.

Alkalen Fosfatazın Üç Boyutlu Yapısı

Alkalen fosfataz enzimi E. Coli bakterisinde oldukça geniş bir şekilde çalışılmıştır. Alkalen fosfatazın yapısı E. Coli'de aydınlatılmıştır. Yapılan bu çalışmalarda E. Coli alkalen fosfataz monomerinin tam olarak aminoasit sekuensi tespit edilmiştir³⁷. Buna göre monomerin 449 aminoasit rezidüsü ile karbohidrat içermeyen bir tek polipeptid zincirden oluştuğu bulunmuştur. E. Coli alkalen fosfataz bir dimerdir. Yapılan bu aminoasit sekuensi sonucunda E. Coli alkalen fosfataz monomerinin molekül ağırlığının 49.058 D olup dimerinin de buna uygun olarak 98.058 D olduğu hesaplanmıştır. Bütün sistein rezidüleri molekül içi disülfid köprüsü oluşturduğundan dolayı serbest -SH grubu içermemektedir. Her bir monomer 10 Histidin rezidüsüne sahip bunlardan bir kaç aktif bölgede metal iyon ligandlarıdır. E. Coli alkalen fosfatazın üç boyutlu yapısı çıkartılıp, sekonder yapısı tespit edilmiştir⁶⁵. Buna göre yaklaşık olarak % 45 α -sarmal, % 13 β -kırmalı paralel ve % 16 β -kırmalı antiparalel konformasyona sahip olduğu açıklanmıştır⁶⁶. Molekülde geriye kalan yapının düzensiz yapı olduğu ifade edilmiştir. E. Coli alkalen fosfatazı iki monomerden oluşan bir dimerdir. Her bir monomerinde birer aktif bölgeye sahiptir. Aktif bölgelerinde ise 3'er metal bağlanma bölgesi vardır. Aktif bölgesinin yapısı tam olarak aydınlatılmıştır. E. Coli AP'sinin aktif bölgesinde iki Zn^{+2} iyonu ve bir tane Mg^{+2} iyonu bulunmaktadır. Enzim kristallendirilebilmiştir. Şematik olarak görüntüsü çizilmiştir. Alkalen fosfatazın aktif bölgesindeki Zn^{+2} metal iyonları ile II B metal iyonları (Co (II), Mn (II), Cu (II) ve Ca (II)) yer değiştirilerek türevleri oluşturulmuştur. Bunlardan sadece Co (II) türevinin (substrat olarak p-nitrofenilfosfat kullanarak) doğal enzime göre yaklaşık olarak % 30 enzimatik aktivite göstermiştir³⁶⁻⁶⁷.



Şekil 3. E. Coli alkaleen fosfatazın aktif bölgesinin şematik görüntüsü



Şekil 4. E. Coli alkaleen fosfataz kristalinin şematik görüntüsü

İnsanda bulunan alkalen fosfataz dört izoenzime sahiptir. Bu izoenzimler dört bölgeden oluşmuş bir gen tarafından kodlanır. Bu izoenzimlerin üçü bulundukları dokuya spesifiklik (TSAP) gösterirken bir tanesi herhangi bir dokuya spesifiklik (TNAP) göstermez.

1. Plasentada bulunan alkalen fosfataz (PLAP),
2. Bağırsakta bulunan alkalen fosfataz (IAP),
3. Germ hücrelerinde bulunan alkalen fosfataz (GCAP),
4. Dokuya nonspesifik alkalen fosfatazdır (TNAP).

Alkalen fosfataz bir glikoproteindir ve hidrofobik glikozilfosfatidil inositol ile hücre membranına bağlı olarak görev yapmaktadır⁹. Enzimin göç eden hücreleri yönlendirdiği ve membrandan lipid ve immunoglobulinler gibi spesifik molekülleri taşıdığı ifade edilmiştir⁶¹.

Moleküler biyolojinin modern devrinde, alkalen fosfalazı kodlayan dört gen klonlanmış ve aminoasit sırası belirlenmiştir. Bu bilgiler ışığında bu izoenzimlerin evrimsel tarihini, yarı yarışmalı inhibisyonlarını, katalitik hidroliz mekanizmasını, germ hücre biyolojisi-ni, membrandan yağ ve immunoglobulinler gibi spesifik moleküllerin transportunu ve göç eden hücrelere yol gösteren enzimin muhtemel rolünü aydınlatmayı sağlamıştır⁶¹.

İnsan AP izoenzimlerinin dördünde aminoasit sekuensi klonlanmış cDNA'dan çıkarılmıştır^{59, 60, 68-72}. TSAP izoenzimlerinin aminoasit sekuenslerinden % 30 ila % 98 özdeşlik gösteren homologlar oldukları bulunmuştur^{73, 74}. TNAP ise TSAP izoenzimle-rinden herhangi biriyle sadece % 50 ila % 65'inin özdeşlik gösterdiği tespit edilmiştir. Enzimler 524'den 535'e kadar değişen uzunluklardaki polipeptidler olarak sentezlenmişlerdir. Dokuya spesifik alkalen fosfatazlardan IAP 509, GCAP 513, PLAP 513 ve dokuya nonspesifik alkalen fosfataz (TNAP) ise 507 aminoasit uzunluğundadır. Hidrofobik signal peptidi (17 ila 22 aminoasit uzunluğunda) doğal proteinin amino u-cundan önce gelir. PLAP ve GCAP moleküllerinde iki tane (Asn 122 ve Asn 249), IAP'de üç tane (Asn 122, Asn 249, ve Asn 410) ve TNAP'de ise 5 tane (Asn 123, Asn 213, Asn 254, Asn 286 ve Asn 413) glikolikasyon bölgesi vardır^{75, 76}.

Aktif bölge rezidüleri, E. Coli AP ve insan AP moleküllerinin aminoasit sekuenslerinin homologlarına dayanılarak teşhis edilmiştir⁷⁷. Aktif bölgede bulunan rezidüler (örneğin; Ser 92, Asp 91, Arg 166 ve Mg^{+2} ve Zn^{+2} metal iyonları 1 ve 2'ye koordine olmuş ligandlar) korunmuşlardır. PLAP'de bulunan Ser 92'nin katalizleme olayı süresince fosforilasyon bölgesinde olduğu doğrulanmıştır⁷⁸. Bu homolog genler, ökaryotik alkale fosfatazın katalizleme mekanizmasının E. Coli alkale fosfataz enziminin katalizleme mekanizmasına benzer olduğunu göstermiştir. Oysa ökaryotik AP'ler ile bakteriyel AP'ler arasında üç farklı özellik bulunmuştur. Örneğin; (a) fosfatidilinositolun fonksiyonu ve bağlanması, (b) inhibisyonunun yarıyarışmalı mekanizması, (c) ekstraselüler proteinlerde protein-protein arası etkileşmelere karışan yüzey lopunun yapısı.

Ökaryotik AP'ler glikozilfosfatidilinositol olarak adlandırılmış yeni kompleks bir yapı ile sitoplazmik membranın dışına bağlanmış bir enzimdir⁷⁵. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, Asp 484 residüsü, PLAP'nin membrana bağlandığı nokta olarak tanımlanmıştır^{79, 76}. Aynı zamanda üç insan TSAP molekülünün sonunda COOH ucunda da Asp 484 rezidüsü var olduğu bulunmuştur^{73, 74}. Bu nedenle, IAP ve GCAP Asp 484'den GPI yolu ile benzer bir şekilde bağlanmış olabileceği düşünülebilir. Oysa bu durumun TNAP için, hatta diğer TSAP türleri için farklı olabileceği belirtilmiştir. Farklı AP izoenzimlerinde -COOH ucundaki hidrofobik peptitlerin sırasında özel bir benzerlik olmadığı görülmüştür⁸⁰. GPI kuyruğuna takılmış olan 484 rezidü Gly, Ala, Cys, Ser ve Asn ile oluşturulan mutantlar plazma membranında görülmüştür. Diğer yer değişimleri ise daha düşük katalitik aktiviteye sahip ve membrana zayıf bir şekilde bağlanmış proteinler üretmiştir.

Bu GPI alkolü, in vitro ortamda saflaştırılmış fosfolipaz C ve in vivo ortamda membrana gömülü fosfolipaz C ile hatta plazma içinde kan dolaşımında bulunan fosfolipaz D ile işlemlerden geçirilerek proteinden koparılabilir⁸¹. Böylece normal fizyolojik şartlar altında membrana bağlı olmayan AP izoenzimlerinin, normal bireylerde, dahası farklı hastalıkları olan kişilerde, kan dolaşımındaki düzeyleri açıklanmıştır. Membrandan kopmuş olan bu izoenzimlerin AP'nin fonksiyonu ile ilgili olup olmadığı açık değildir⁶¹.

Alkalen fosfatazı kodlayan genler homolog olmalarına rağmen birbirinden net olarak ayrılan farklılıklarının da olduğu ifade edilmektedir. IAP normalde, fetal ve yetişkin bağırsak mukozasında, özellikle epitel hücrelerinde daha çok bulunduğu ifade edilmiştir⁸². PLAP gebeliğin 8. haftasından başlayarak gebelik boyunca syncytio trophoplast hücrelerinde bulunmuştur⁸³. GCAP, normal yetişkin testislerinde germ hücre olgunlaşmasının ilk basamakları süresince eser miktarda ve timüste bulunur^{84, 85}.

Dokuya nonspesifik alkalen fosfatazın (TNAP) sağlıklı bir insan serumunda bulunan total alkalen fosfataz aktivitesinin yaklaşık olarak % 95'ini oluşturduğu tespit edilmiştir^{86, 87}. TSAP yüksek bir oranla bulunduğu dokuya spesifiklik gösterirken, TNAP, kemik, karaciğer, dalak, böbrek, öd, akciğer ve gebeliğin 8. haftasına kadar plasentayda içine alan bir çok dokuda bulunmuştur⁸⁸. Hamileliğin 8. haftasından 12. haftasına kadar TNAP aktivitesi gittikçe azalırken, PLAP'nin aktivitesi yükselmiş, 12. haftanın sonunda plasentada bulunan tek AP izoenziminin PLAP olduğu bulunmuştur⁸³. Bulundukları dokuya bağımlı olarak, bir tek TNAP izoenziminin glikolikasyonla bağdaşan farklı elektroforetik mobilite ve sıcaklık stabilite özellikleri göstermiştir. Bu nedenle bu dokulardan ekstrakte edilen bu izoenzim, TNAP izoenziminin izoformları olarak ifade edilmişlerdir.

TSAP izoenzimlerinde de izoformlarının var olduğu bulunmuştur. Fetal ve yetişkin IAP formu olarak isimlendirilen IAP izoenzimi için farklı izoformların bulunduğu belirlenmiştir. İzofomların cDNA'larının klonlanması ile aynı protein yapısına sahip oldukları bulunmuştur. Yani aynı izoenzimlerin izoformları bir tek gen tarafından kodlanır. Bu çeşitliliğin sebebi ise, glikolikasyon veya PLAP-IAP veya GCAP-IAP heterodimerik moleküllerinin formasyonundaki farklılıktan dolayı olabileceği sonucuna varılmıştır⁶¹.

Kemik alkalen fosfatazı ve karaciğer alkalen fosfatazı aynı izoenzimin izoformlarıdır. Bu izoenzimler, glikolikasyonun bir sonucu olarak farklılaşarak izoformları oluşturur⁸⁹.⁹⁰. Sağlıklı bir insan serumunda HPLC kullanılarak dokuya nonspesifik alkalen fosfatazın altı farklı izofomu ayrılmıştır. Bunlardan üçü kemik alkalen fosfatazı (BLAP) (B/I, B₁, B₂) ve üç tanesi ise karaciğer alkalen fosfatazı (LALP), (L₁, L₂, L₃)'dır^{91, 92}. Kemik alkalen fosfataz izoformlarından en küçük fraksiyon olan B/I, % 70 kemik

(izoformların büyük fraksiyon B₁, B₂) ve % 30 bağırsak alkalen fosfatazından oluşmuştur.

Kemik alkalen fosfatazı fosfolipaz C ile (GPI-PLC) işleminden geçirildiğinde B₁ ve B₂'nin biyokimyasal özelliklerinin değişmediği görülmüştür. Bu sonuçtan yola çıkılarak serumda bulunan iki major fraksiyonun, B₁ ve B₂, hücre membranı bileşenlerinden (GPI'den) ziyade farklı glikolikasyondan kaynaklandığı bulunmuştur⁹.

Kemik farklı bölgelerinde yapılan çalışmalarda cortical kemik B₁ ve osteokalsince zengin olduğu oysa trabecular kemikte B₂ aktivitesinin daha fazla olduğu bulunmuştur⁹.

Sağlıklı yetişkinlerde kemik alkalen fosfatazı HPLC ile B₁, B₂ ve B/I olmak üzere üç izoformuna ayrılmıştır. Ağır böbrek yetmezliği olan hastalarda ise HPLC metodu ile kemik alkalen fosfatazının üç izoformuna ilaveten B_{1x} olarak adlandırılan bir izoformu daha izole edilmiştir. B_{1x} izoformu sağlıklı yetişkinlerde ve çocuklarda⁹³, büyüme hormonu eksikliği olan hastalarda⁸⁶, hipofosfatazia, raşitizm, Paget hastalığı ve metabolik kemik hastalıklarında⁹⁴ gözlenmemiştir. B_{1x} izoformu sadece ağır böbrek yetmezliği olan hastaların % 60'ında ortaya çıkmıştır.

Alkalen fosfataz izoformlarının ve izoenzimlerinin ayrılması klinik anlamda önemlidir. Çünkü bir çok hastalıkta, bu izoenzimlerin seviyesinde önemli değişiklikler meydana gelmiştir. Sağlıklı bireylerin alkalen fosfataz aktivitesi ve hasta insanların alkalen fosfataz aktivitesi karşılaştırılarak bazı hastalıkların teşhisinde kullanılmıştır. Bu nedenle alkalen fosfataz izoformlarının ayrılması için bir çok metod geliştirilmiştir⁸⁹. Elektroforez, kimyasal inhibisyon ve sıcaklık inhibasyonu metodları kemik alkalen fosfatazını diğer izoformlardan ayırmak için kullanılmıştır. Fakat bu metodların hepsi teknik olarak zor ve düşük kararlılığa sahiptir⁹⁵.

Kemik ve karaciğer alkalen fosfataz izoformları içerdikleri karbohidrat içerikleri farklılığından yararlanılarak da birbirinden ayrılabilmiştir. Kemik alkalen fosfatazı karbohidrat yan zincirinde N-asetilglukozamin bulunmaktadır. Fakat karaciğer alkalen fosfatazı karbohidrat yan zincirinde bulunmamaktadır. Bu özellikten yararlanılarak

Lectin ile kemik alkalen fosfatazı çöktürülerek karaciğer alkalen fosfatazından ayrılmıştır^{73, 96-98}.

Alkalen Fosfatazın Hastalıklarla İlişkisi

Ergenlikteki büyüme dönemi süresince⁹³ ve büyüme hormon yetersizliği gibi hastalarda⁸⁶, hipofosfazia, raşitizm, Paget hastalığı, kemik kırılmalarında ve metabolik kemik hastalıklarında⁹⁴ BALP izoformları arasında seçimli farklılıkların olduğu tespit edilmiştir⁹.

Serumda bulunan kemik alkalen fosfataz izoformlarının her üçünde, kontrollerle karşılaştırıldığında büyüme hormonu eksikliği olan yetişkinlerde daha yüksek çıkmıştır. Özellikle kemik izoformlarından olan B₁ sağlıklı insanlarınkinden çok daha yüksek olduğu bulunmuştur. Bunun sebebi bilinmemektedir⁸⁶.

Sağlıklı bireylerle, osteoporozlu ve hipertiroidizmlili hastalar ile karşılaştırıldığında, hasta olan bireylerin alkalen fosfataz aktivitelerinin yüksek olduğu görülmüştür⁸⁹.

Hem diabet hastalarının hemde deneysel olarak insülin eksikliği meydana getirilen laboratuvar farelerinin kemik ve mineral metabolizmalarında değişme gözlenmiştir⁹⁹.¹⁰⁰ Aynı zamanda kronik diabetik serum alkalen fosfataz aktivitesinin yükseldiği saptanmıştır^{101, 102}.

Alkalen Fosfatazın İskelet Sistemindeki Rolü

İskelet sisteminde gelişme, kemiklerin büyümesi ve şekillenmesi, oluşumu ve yıkımı içine alan kompleks bir süreçtir. İskelet yapısının oluşumu ve yıkımı hayat boyu devam eder ve iskelet sisteminin metabolik rolü için temeldir. Bu süreç sırasıyla alkalen ve asit fosfatazlarca zengin osteoblast ve osteoclastlarda olur. Osteoblastlar kemik matriksini sentezler ve bu matriks kalsiyum tuzları ile sertleşir. Osteoklastlar ise kemik mineral ve matriksini azaltarak iskeleti resorbe eder. Matriks vezükülleri olarak adlandırılan extrasellular membrana bağlı yapılar içinde mineralizasyon başlar¹⁰³. Bu vezüküller

içerisinde nonspesifik alkale fosfataz, ATPaz ve pirofosfataz aktivitesi ve polisakkaritler, fosfolipidler ve glikolipidler bakımından zengindir. Hekzogonal kristalleri oluşumu süresince ilk olarak matriks vezikülleri içinde gözlemlendi. Sonunda ekstra veziküler kristal büyümesi gözlemlendi⁶¹.

1923'de Robinson kemikleşen kırıkdağın fosfataz aktivitesince zengin olduğunu keşfetmiştir. Bu fosfatazların serbest P_i üretmek için bazı bilinmeyen fosfat esterlerinin hidrolizi ile iskelet mineralizasyonunda görev aldığını öne sürmüştür¹². Çeşitli mekanizmalar öne sürülmesine rağmen bugüne kadar iskelet mineralizasyonunda kemik alkale fosfatazının görevi hala açık değildir. İskelet oluşumunda nonspesifik alkale fosfatazın rolünü kanıtlayan en önemli delil, kalıtsal metabolik kemik hastalığı olan hipofosfatazianın kusurlu iskelet mineralizasyonu ve eksik alkale fosfataz aktivitesi ile karakterize edilmesiyle sağlanmıştır¹⁰⁴.

Alkale fosfataz 1995 yılında mumya kemiklerinden izole edilmiştir. Çalışmada kullanılan mumyaların Mısır mumyaları olduğu söylenmektedir. Bu çalışmada izole edilen alkale fosfatazın hala aktif olduğu tespit edilmiş olup bunlarla karşılaştırmak amacıyla taze insan kemiklerinden de alkale fosfataz izole edilmiştir. Bu çalışma sonucunda mumya kemiklerinden izole edilen AP'nin bir alt birime sahip olduğu bulunmuştur. Molekül ağırlığının 190 ± 10 kD ve alt biriminin ise 60 kD olduğu tespit edilmiştir. Alt birimi aktif değildir. Taze insan kemiklerinden izole edilen AP ise 200 kD ve alt biriminin 60 kD olduğu bulunmuştur. Mumya ve taze insan kemiklerindeki alkale fosfatazın spesifik aktiviteleri sırasıyla 130 ± 3 mU/mg ve 180 mU/mg olarak tespit edilmiştir. Çalışmada kullanılan taze insan kemikleri bir hastanenin ameliyathanesinden elde edilmiştir¹⁰⁵.

Kemik Dokusu

Kemik dokusu kesilmeyecek kadar sert olan bir dokudur. Kemik dokusunun % 30 organik madde ve % 70 minerallerden oluşmuştur. Diğer destek dokuları gibi hücreler ve hücreler arası esas maddeden yapılmıştır. Kemik dokusunun basınç, eğilme, bükülmele-

re karşı dayanıklılığa ara maddenin kireç bileşikleri ile sertleşmesinden ve özel yapısından ileri gelmektedir. Hayati önemi yüksek doku ve organların, örneğin, merkez sinir sistemi, kemik iliği sistemi kemik dokusuyla korunmuş olması bunların fonksiyonlarını iyi bir şekilde yapmalarını sağlar.

Kemik dokusunun hücrelerarası esas maddesi; fibriller, mukopolisakkarit tabiatında Osteoid-Ossein adı verilen amorf homojen yapıştırıcı organik maddeler ile çeşitli inorganik tuzlardan yapılmıştır. Yetişkin bir insanda kemik dokusunun kimyasal analizinde kuru ağırlığın % 25'ini kollagen, % 15 su, % 1, 25 diğer proteinler % 60-65'i ise inorganik maddelerden oluştuğu saptanmıştır. İnorganik maddelerin % 85'ini kalsiyum fosfat, % 10 kalsiyum karbonat, % 5 ise magnezyum ve diğer organik tuzlardır. İnorganik maddeler kollagen demetleri arasında ve üzerinde toplanmıştır. Bu tuzlar (Hidroksilapatit) hegzogonal kristalleridir. Kemik dokusunun kimyasal analizinde verilen oranlar yaşam süresince değişir. Organik maddelerin miktarı ve mineraller bireyler yaşlandıkça artar buna karşılık su miktarları azalır. Kemik dokusunun kendine has sertliği veren kalsiyum tuzlarıdır.

Kemik hücreleri; Kemik dokusunda 3 çeşit hücre vardır;

1. Osteoblastlar
2. Osteocyler
3. Osteoclastlar'dır.

Bu hücreler birbirine dönüşebilirler.

Osteoblastlar; Bu hücreler kemik yapıcı hücrelerdir. 15-20 mikron büyüklüğündedir. Uzantıları ile birbirine bağlanırlar. Fosfatazlarca zengindirler. Kemik yapım fonksiyonları bitince Osteocyt haline dönüşürler.

Osteocyt; Kemik dokuda Lacum ve Osteoplast adı verilen boşluklar içinde bulunurlar. Bulundukları boşluğun şeklini alırlar. İnce sitoplazmik uzantıları, kemik boşluklarını birbirine bağlayan kemik kanaliküllerinden geçerek komşu osteocytlere uzanırlar.

Osteoclastlar; 30-100 mikron büyüklüğündedirler. Osteoclastlar gelişmekte olan kemiklerin poliferasyon bölgesinde bulunurlar. Esas fonksiyonları kemik resorpsiyonunu sağlamaktır. Bu hücrelerin sitoplazmalarında asit fosfatazlar fazla olup, kemiklerin resorpsiyonu fermentatif yolla bu enzimler aracılığı ile sağlanmaktadır. Eritilen kemikler parçacıkları ve partikülleri pinositoz yolu ile osteoclastların sitoplazmalarına alınır-lar.

Kemik dokusunun gelişmesi embriyoda ve ileriki hayat devresinde destek dokuları örneğin; bağ doku ve kıkırdak dokunun kireçlemesi ile meydana gelir.

Kemikleşmenin takip ettiği gelişme kademesi iki türdür:

1. Desmal ossifikasyon (bağ dokudaki kemikleşme)
2. Chondral ossification (kıkırdak dokunun kemikleşmesi)

ikiye ayrılır;

- a. Kıkırdığın yüzeyinden başlayan perikondral ossification
- b. Kıkırdığın yüzeyinin yanısıra iç kısmından başlayan enchondral ossification¹⁰⁶.

Yapılan bu çalışmanın amacı, bugün artık gezegenimizde yaşamayan bu canlıya ait alkalen fosfataz enziminin, bağlanma şekillerine göre; dış periferik, sitozolik, iç periferik ve integral olmak üzere dört kademe de ayrı ayrı saflaştırılması hedeflenmiştir. Nesli tükenmiş olan bu varlığa ait kemiklerde çalışma yapılmıştır. Bundan dolayı yapılan bu çalışmada kemik yapıcı enzim olan alkalen fosfataz enzimi izole edilmesi amaçlanmıştır.

2. MATERYAL VE YÖNTEMLER

2. 1. Kullanılan Kimyasal Madde ve Malzemeler

Çalışmada kullanılan standart serum albumin, N,N,N',N'-tetrametiletilediamin (TE-MED), N,N'-bisakrilamid, glisin, metanol, asetik asit, amonyum persülfat (PER), gliserin, bromtimol mavisi, commassie brillant blue G-250, 1-bütanol, potasyum klorür, Triton X-100, sodyum hidroksit, sodyum klorür, Magnezyum klorür, TEAE-selüloz, Sephadex G-200, Sephadex G-150, Sephadex G-25, ditioeritritol, p-nitrophenilfosfat ve Tris (trihidroksimetilaminometan) tabletleri, diyaliz torbası, glisin, sodyum asetat, kal-siyum klorür, coomassie brillant blue R-250 Sigma Chemical Corp.'dan sağlanmıştır. Tonocalsin piyasadan sağlanmıştır.

2. 2. Yararlanılan Alet ve Cihazlar

Soğutmalı Santrifüj	: Heraus Sepatech
Spectrofotometre	: Pharmacia LKB-Biochrom, ULTROSPEC-III
pH metre	: Schott C6 840 pH metre
Elektroforez tankı	: OWL (Separation systems)
Peristaltik pompa	: Cole-Parmer Instrument Co
Hassas terazi	: Mettler Ha 51 Gallenkamp
Kromatografi kolonu	: Cole-Parmer Instrument Co
Otomatik pipetler	: Fisher
Gradient mixer GH-Y	: Pharmacia Fine Chemicals
Wortex	: Fisons
Çalkalayıcı	: GFL
Magnetik karıştırıcı	: Ika Combimag RCO
Ultrasonik dismembratör	: Fisher Scientific-550, (USA)

2. 3. Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanması

Araştırma süresince kullanılan tampon çözeltiler ve hazırlanış biçimleri aşağıdaki gibidir.

I. Homojenat hazırlamak için kullanılan tampon; 0,01 M Tris-HCl, pH: 7,5 içinde 2 mM $MgCl_2$; 1,211 gr (0,01 mol) tris ve 0,408 gr (2×10^{-3} mol) $MgCl_2 \times 6H_2O$ 950 ml deiyonize suda çözüldü. 1 N HCl ile pH: 7,5'e kadar titre edildi. Toplam hacim deiyonize su ile 1 litreye tamamlandı.

Hazırlanan bu çözelti TEAE-selüloz iyon değişim ve Sephadex G-200 jel filtrasyon kolonunun dengelenmesinde ve yıkanmasında kullanıldı.

II. TEAE-selüloz kolonu elüsyon tamponu; 0'dan 1M'a NaCl ile bir konsantrasyon gradienti oluşturularak elüsyon yapıldı.

0,01 M Tris-HCl içinde 1M NaCl, pH: 7,5; 0,3634 gr (0,01 mol) tris ve 15,55 gr NaCl 250 ml saf suda çözüldü. 1 N HCl ile pH: 7,5'e kadar titre edildi. Toplam hacim saf suyla 300 ml'ye tamamlandı.

0,01 M Tris-HCl, pH: 7,5; 1,211 gr (0,01 mol) tris 950 ml saf suda çözüldü. 1 N HCl ile pH: 7,5'e kadar titre edildi ve toplam hacim saf suyla 9 litreye tamamlandı.

III. Optimum pH: çalışması için kullanılan çözeltiler; pH: 3,5-5,5 aralığında CH_3COONa , pH: 6-8,5 aralığında Tris-HCl ve pH: 9-11 aralığında ise Glisin tamponu kullanıldı.

pH: 3,5-5,5 aralığında 20 mM $MgCl_2$ içeren 0,2 M CH_3COONa tamponu kullanıldı. 2,72 gr (0,02 mol) $CH_3COONa \times 3H_2O$ ve 0,408 gr (0,002 mol) $MgCl_2 \times 6H_2O$ 80 ml deiyonize suda çözüldü. 1 N HCl ve 1 N NaOH ile istenilen pH: 'lar ayarlandıktan sonra saf suyla toplam hacim 100 ml'ye tamamlandı.

pH: 6-8,5 aralığında 20 mM MgCl_2 içeren Tris-HCl tamponu kullanıldı. 2,422 gr (0,002 mol) tris ve 0,408 gr (0,002 mol) $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 80 ml saf suda çözüldü. 1 N HCl ve 1 N NaOH ile istenilen pH'lara ayarlandıktan sonra toplam hacim saf suyla 100 ml'ye tamamlandı.

pH: 9-11 aralığında 20 mM MgCl_2 içeren Glisin tamponu kullanıldı. 1,501 gr (0,02 mol) Glisin ve 0,408 gr (0,002 mol) $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ 80 ml saf suda çözüldü. 1 N HCl ve 1 N NaOH ile istenilen pH' lara ayarlandıktan sonra toplam hacim saf suyla 100 ml'ye tamamlandı.

IV. Coomassie brilliant blue G-250 renk reaktifi (Proteinlerin kantitatif tayininde kullanılan çözelti); 100 mg coomassie brilliant blue G-250, 50 ml % 95'lik etanol'de çözüldü. Bu çözeltiye % 95'lik fosforik asit ilave edildi. Çözeltinin hacmi saf suyla 1 litreye tamamlandı.

V. SDS elektroforezinde kullanılan numune tamponu; % 5 ml 1 N HCl (pH: 6,8), 3 ml % 1'lik SDS ve 1 ml % 100 gliserin ve 1 ml % 0,1'lik brom timol mavisinden karıştırılarak hacimlerinin saf su ile 10 ml'ye tamamlanması ile hazırlandı. Bu tampon kullanılmadan hemen önce 1 ml numune tamponuna 50 μl olacak şekilde β -merkaptoetanol ilave edildi.

VI. SDS-elektroforezinde kullanılan yürütme tamponu; 1,5 gr tris ve 7,2 gr glisin, 50 ml suda çözüldü. Daha sonra bunun üzerine 5 ml % 1'lik SDS ilave edilerek hacim saf su ile 500 ml'ye tamamlandı.

2. 4. Kullanılan çözücülerin saflaştırılması

Deneylerde kullanılan tüm organik çözücülerin ve kimyasal maddelerin saflaştırma işlemleri literatürde açıklanan şekilde yapıldı.

2. 4. 1. Etil Alkol

Etanol, CaO ile birlikte geri soğutucu altında refluks edildikten sonra destile edildi. Çok saf etanol elde etmek için geri soğutucu takılı iki litrelik dibi yuvarlak bir balona, 5 gr Mg, 0,5 gr I₂ ve 70 ml CaO üzerinden destillenmiş etanol konuldu. İyodun rengi gidinceye kadar refluks edildi. Sonra CaO üzerinden destillenmiş 900 ml etanol katılarak yarım saat daha refluks edildi. Atmosfer basıncında destillendi.

2. 5. YÖNTEMLER

2. 5. 1. Protein tayini

2. 5. 1. a. Kantitatif Protein Tayini

Kromatografi işlemleri sırasında eşit hacimde alınan bütün fraksiyonlarda kantitatif protein tayini yapıldı. Bu metodun esası; 280 nm’de proteinlerin yapısında bulunan triptofan ve tirozinin maksimum absorbens göstermesi esasına dayanmaktadır¹⁰⁷. Fraksiyonlar kuartz küvetlere alınarak, absorbensları spektrofotometrede köre karşı okundu.

2. 5. 1. b. Coomassie Blue Yöntemiyle Protein Tayini

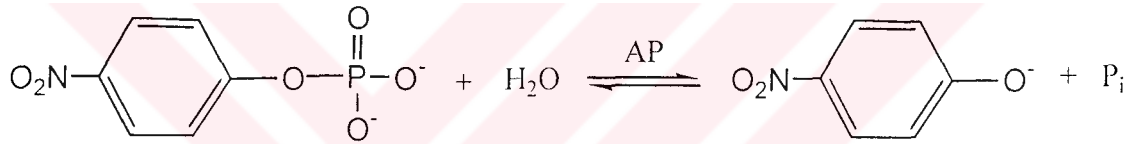
Bu yöntemle Sephadex G-200 jel filtrasyon ve TEAE-selüloz iyon değişim kolonundan saflaştırılan enzim çözeltisindeki ve homojenatlardaki protein miktarı belirlendi. Bu yönden coomassie brilliant blue G-250’nin fosforik asitli ortamda proteinlere bağlanması esasına dayanır. Oluşan kompleks 595 nm’de maksimum absorbens gösterir. Proteine boyanın bağlanması çok hızlı gelişir (2 dakika). Bu yöntemin hassasiyeti 1-100 mikrogram arasındadır¹⁰⁸.

Tayin işlemleri şöyle yapıldı; 1 ml’inde 0,1 mg protein ihtiva eden standart sığır albümin çözeltisinden tüplere 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 ve 100 µl alındı. Saf su ile tüm tüplerin hacmi 0,1 ml’ye tamamlandı. 5 ml coomassie blue reaktifi tüplere ilave edildi ve vortex ile karıştırıldı. 10 dk sonra 595 nm’de 3 ml’lik küvetlerde köre karşı

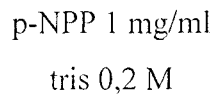
absorbans değeri okundu. Kör olarak 0,1 ml aynı tampon ve 5 ml commassie blue reaktifinden oluşan karışım kullanıldı. Absorbans değerlerine karşılık gelen mikrogram protein değerleri standart grafik haline getirildi (Şekil 1).

2. 5. 2. Alkalen Fosfataz Aktivitesi Tayini

Alkalen fosfataz enziminin saflaştırılması ve kinetik işlemlerin esnasında aktivite ölçümleri bu yöntemle yapıldı. Alkalen fosfataz aktivitesi çoğunlukla p-nitrofenilfosfat substrat olarak kullanılarak tayin edildi⁴⁰. Prensip olarak, alkalen fosfataz enzimi substrat olarak kullanılan p-nitrofenilfosfatı p-nitrofenolat iyonuna hidroliz etmekte ve p-nitrofenalat iyonu ise 410 nm’de absorbans vermektedir. Reaksiyon denklemi şöyledir.



Aktivite tayini şu şekilde yapıldı; Sigma’dan sağlanan alkalen fosfataz aktivite tayini için özel hazırlanmış p-nitrofenilfosfat ve Tris tabletleri kullanıldı. Belirtilen prosedüre uygun olarak birer tane p-nitrofenilfosfat ve tris tabletleri 20 ml saf suda vortex yardımıyla çözüldü. Hazırlanan substrat tamponu 1 saat içerisinde kullanıldı. Hazırlanan bu substrat tamponunda şu konsantrasyonlar oluştu:



Biri köre biri numuneye olmak üzere iki tüp hazırlandı. 1. tüpe 0,5 ml enzim ve 0,5 ml substrat konularak tayin başlatıldı. 30 dk sonunda oda sıcaklığında spektrofotometrede 410 nm dalga boyunda köre karşı absorbans değeri okundu. Kör olarak 0,5 ml substrat ve 0,5 ml enzimsiz tampon kullanıldı. Köre karşı okunarak substratın kendi kendine hidroliz olmasından meydana gelecek hata engellenmiş oldu.

2. 5. 3. TEAE-Selüloz İyon Değişim Kolonunun Hazırlanması

20,1558 gr TEAE-selüloz 200 ml 0,5 N HCl ile aktifleştirildi. Kullanılan HCl iyon değişim uçlarının dışarı çıkmasını sağladı. 0,5 N NaOH ile yıkanarak ortam nötralize edildi. Jel tampon içine alındı. Kromatografi kolonuna bir huni yardımıyla tampon dolduruldu. Hazırlanan jel peristatik pompa yardımıyla kolona paketlenildi. Kolon aynı tampon çözelti ile dengelendi. Kolonun dengelendiği üstten alınan sıvı ile alttan alınan sıvının absorbanlarının aynı olması ile anlaşıldı.

2. 5. 4. Sephadex G-200 Jel Filtrasyon Kolonunun Hazırlanması

1,6029 gr kuru Sephadex G-200 200 ml tampon çözelti içine alındı. Oda sıcaklığında bir gece bekletildi. Su trompu ile hava kabarcıkları uzaklaştırıldı. Daha sonra 1,5 x 30 cm ebatlarındaki kromatografi kolonuna bir huni yardımıyla tampon çözelti dolduruldu. Peristatik pompa yardımıyla, hazırlanan jel, kolona paketlenildi. İki gün süreyle aynı tampon ile kolon dengelendi. Kolonun dengelendiği üstten alınan sıvı ile alttan alınan sıvının absorbanlarının aynı olması ile belirlendi.

2. 5. 5. Antik İnsan Kemikinden Total Olarak Alkalen Fosfataz Enziminin Saflaştırılması

2. 5. 5. a. Antik İnsan Kemiklerinin Temin Edilmesi ve Homojenat Hazırlanması

Antik insan kemikleri Erzurum'un Çiğdemli Höyüğünde yapılan arkeolojik çalışmalarda bulunmuştur. Arkeoloji bölümünde yapılan çalışmalarda kemiklerin yaşı yaklaşık olarak 3000 yıl olarak belirlenmiştir. Arkeoloji bölümünden sağlanan bu kemiklerde önce K. K. B. Eğitim Fakültesi Biyoloji bölümünde mikroskobik incelemelerle mikroorganizmaların varlığı araştırıldı. Herhangi bir mikroorganizmaya rastlanmadı. Kemik dokusundan ince bir kesit alınarak elektron mikroskobunda bakıldı ve bunun sonucunda hücre yapısının korunduğu görüldü.

Kemik dokusu bilyeli değirmenlerde öğütülerek küçük parçalar haline getirildi. Öğütülmüş kemiklerden 140 gr'ı alındı ve 600 ml 2 mM $MgCl_2$ içeren 0,01 M Tris-HCl pH: 7,5 tampon çözeltisinin içine alındı. Buz banyosunda soğutulan homojenat magnetik olarak karıştırılırken, üzerine soğuk 1-bütanol (200 ml) yavaş yavaş ilave edildi. 1 saat karıştırılarak sabit bir emülsiyon oluşturuldu. Sonra bu karışımın sıcaklığı su banyosu yardımıyla 37°C'ye yükseltildi ve 10 dk bu sıcaklıkta bekletildi. Karışımın 4°C'de 14600 x g'de 30 dk süresince soğutmalı santrifüjde santrifüj edildi. Üst bütanol fazı alındı. Süpernatant 0,01 M pH: 7,5 Tris-HCl tamponuna karşı (tampon çözelti üç kez değiştirilmek üzere) diyaliz edildi. Homojenat kolona tatbik edilecek duruma gelmiş oldu³⁵.

2. 5. 5. b. Antik İnsan Kemiğinden Elde Edilen Homojenatın Sephadex-G-200 Jel Filtrasyon Kolonuna Yüklenmesi ve Elüsyon Alınması

Hazırlanan homojenat önceden dengelenmiş Sephadex G-200 jel filtrasyon kolonuna yüklendi. Kolona yükleme yapılırken fraksiyonlar toplanmaya başlandı. 2 mM $MgCl_2$ içeren 0,01 M pH: 7,5 Tris-HCl tamponu ile 5 ml'lik fraksiyonlar peristaltik pompa vasıtasıyla toplandı. 280 nm dalga boyunda absorbans vermeyinceye kadar elüsyona devam edildi. Alınan fraksiyonlarda spektrofotometrede 280 nm dalga boyunda kantitatif protein tayini yapıldı. Absorbans veren tüplerde aktivite tayini yapıldı. Alkalen fosfataz aktivitesi gösteren tüpler birleştirildi ve 2 mM $MgCl_2$ içeren 0,01 (pH: 7,5) Tris-HCl tamponuna karşı diyalizlendi³⁵.

2. 5. 5. c. Sephadex G-200 Kolonundan Elde Edilen Enzim Çözeltisinin TEAE-Selüloz İyon Değişim Kolonuna Yüklenmesi ve Elüsyon Alınması

Önceden dengelenmiş TEAE-selüloz iyon değişim kolonuna, diyalizlenmiş homojenat yüklendi. Kolon 2 mM $MgCl_2$ içeren 0,01 M (pH: 7,5) Tris-HCl tamponu ile yıkandı. Kolonunun yıkanıp yıkanmadığı altan ve üstten alınan tamponun 280 nm dalga boyunda aynı absorbans göstermesi ile anlaşıldı. Gradient mikser'den yararlanarak 0'dan 1 M'a NaCl ile sürekli bir konsantrasyon gradienti oluşturularak elüe edildi. 3 ml'lik fraksiyonlar toplandı. Toplanan fraksiyonlarda 280 nm dalga boyunda spektrofotometrede

kantitatif protein tayini yapıldı. Absorbans gösteren tüplerde aktivite tayini yapıldı. Alkalen fosfataz aktivitesi gösteren tüpler birleştirildi. 2 mM $MgCl_2$ içeren 0,01 M (pH: 7,5) Tris-HCl tamponuna karşı diyalizlendi. Bütün kinetik çalışmalar ve elektroforez bu enzim çözeltisi ile yapıldı³⁵.

2. 5. 6. Antik Fil Kemiğinden Alkalen Fosfataz İzoenzimlerinin Ayrı Ayrı Saflaştırılması

2. 5. 6. a. Antik Fil Kemiğinin Temin Edilmesi ve Homojenat Hazırlanması

Antik Fil kemikleri 1986 yılında Erzurum'un Pasinler ilçesi merkezinden 9 km uzaklıkta bulunan Yayladağ köyünde arkeolojik kazılarda bulunmuş ve müzeye teslim edilmiştir. Bulunan bu kemiklerde yapılan incelemelerde Kuzeydoğu Anadolu Step Fili (*Elephas Trogontherii*) olarak isimlendirilen bir fil türüne ait oldukları saptanmıştır. Almanya'da yapılan çalışmada kemiklerin yaşının yaklaşık olarak 300,000 ile 800,000 yıl arasında olduğu tespit edilmiştir¹⁰⁹. Müzeden alınan antik fil kemiği K. K. B. Eğitim Fakültesi Biyoloji bölümünde herhangi bir mikroorganizma taşıyıp taşımadığı araştırılmış ve herhangi bir mikroorganizmaya rastlanmamıştır. Antik fil kemikleri biyeli değirmenlerde öğütülerek küçük parçalar haline getirildi.

I. Dış Periferik Alkalen Fosfataz Enzimi İçin Homojenat Hazırlanması

Öğütülen 166 gr kemik 180 ml 1 M KCl içine alındı ve arasıra karıştırılarak 3-4 saat bekletildi. Soğutmalı santrifüjde 4°C 18186 xg'de 30 dak santrifüj edildi. Süzgeç kağıdından süzülerek süpernatant ve çökelek ayrıldı. Ayrılan süpernatant 50 ml CCl_4 ile yıkanarak ortamdaki yağlar ekstrakte edildi. Homojenat 2 mM $MgCl_2$ içeren 0,01 M Tris-HCl (pH: 7,5) tamponuna karşı diyalizlendi. Böylece homojenat kolona yüklenecek duruma geldi¹¹⁰.

II. Sitozolik Alkalen Fosfataz Enzimi İçin Homojenat Eldesi

I'deki çökelek 1 M KCl ile yıkandı. Sıvı azot ile donduruldu ve çözüldü. Her gramına 3 ml gelecek şekilde 2 mM $MgCl_2$ içeren 0,01 M Tris-HCl (pH: 7,5) tamponu içine alındı ve 4 saat süreyle dışardan soğutularak ultrasonik dismembratör'de ses dalgalarına maruz bırakıldı. Daha sonra 4°C'de soğutmalı santrifüjde 12186 xg'de 30 dak santrifüj edildi. Süzgeç kağıdından süzülerek süpernatant ve çökelek ayrıldı. Ayrılan süpernatant CCl_4 ile yıkanarak ortamdaki yağlar uzaklaştırıldı. Homojenat 2 mM $MgCl_2$ içeren 0,01 M Tris-HCl (pH: 7,5) tamponuna karşı diyalizlendi. Böylece homojenat kolona yüklenecek duruma geldi¹¹⁰.

III. İç Periferik Alkalen Fosfataz Enzimi İçin Homojenat Eldesi

II. deki çökelek, 0,01 M Tris-HCl tamponu ile yıkandı. 210 ml 1 M KCl içine alındı. Arasına karıştırılarak 4 saat 1 M KCl içinde bekletildi. Ardından soğutmalı santrifüjde 4°C'de 12186 xg'de 30 dak santrifüj edildi. Süzgeç kağıdından süzülerek süpernatant ve çökelek ayrıldı. Ayrılan süpernatant CCl_4 ile yıkanarak ortamdaki yağlar ekstrakte edildi. Homojenat 2 mM $MgCl_2$ içeren 0,01 M Tris-HCl (pH: 7,5) tamponuna karşı diyaliz edildi. Böylece homojenat kolona tatbik edilecek duruma geldi¹¹⁰.

IV. İntegral Alkalen Fosfataz Enzimi İçin Homojenat Eldesi

III. deki çökeleğin her gramına 3 ml gelecek şekilde % 0, 1'lik Triton X-100 içeren 2 mM $MgCl_2$ içeren 0,01 M (pH: 7,5) Tris-HCl tamponu içine alındı ve dört saat süreyle buz banyosu içinde ultrasonik dismembratör'de ses dalgalarına maruz bırakıldı. Ardından soğutmalı santrifüjde 4°C'de 12186 xg'de 30 dak santrifüj edildi. Süpernatant süzgeç kağıdından süzülerek çökelek atıldı. Süpernatant 2 gün saf su, 1 gün 2 mM $MgCl_2$ içeren (pH: 7,5) 0,01 M Tris-HCl tamponuna karşı diyalizlendi. Daha sonra CCl_4 ile yıkanarak ortamdaki yağlar ekstrakte edildi. Böylece homojenat kolona yüklenecek duruma geldi¹¹⁰.

2. 5. 6. b. Antik Fil Kemiğinden Hazırlanan Homojenatların Sephadex-G-200 Jel Filtrasyon Kolonuna Yüklenmesi ve Elüsyon Alınması

Hazırlanan jel kolona paketlenmiştir. 2mM $MgCl_2$ içeren 0,01 M (pH: 7,5) Tris-HCl tamponu ile dengelendi.

I. Dış Periferal Alkalen Fosfataz Enzimi İçin Hazırlanan Homojenatın Sephadex G-200 Jel Filtrasyon Kolonu Yüklenmesi ve Elüsyon Alınması

156 ml homojenat Sephadex G-25 ile derişikleştirilip, önceden dengelenmiş kolona yüklendi. 2 mM $MgCl_2$ içeren 0,01 M pH: 7,5 Tris-HCl tamponu ile 5 ml'lik fraksiyonlar peristaltik pompa vasıtasıyla toplandı. 280 nm dalga boyunda absorbands veremeyinceye kadar elüsyona devam edildi. Alınan fraksiyonlarda spektrofotometrede 280 nm dalga boyunda kantitatif protein tayini yapıldı. Absorbans veren tüplerde aktivite tayini yapıldı. Alkalen fosfataz aktivitesi gösteren tüpler birleştirildi ve 2 mM $MgCl_2$ içeren 0,01 (pH: 7,5) Tris-HCl tamponona karşı diyaliz edildi³⁵.

II. Sitozolik Alkalen Fosfataz Enzimi İçin Hazırlanan Homojenatın Sephadex G-200 Jel Filtrasyon Kolonu Yüklenmesi ve Elüsyon Alınması

165 ml homojenat Sephadex G-25 ile derişikleştirilip, önceden dengelenmiş kolona yüklendi. 2 mM $MgCl_2$ içeren 0,01 M pH: 7,5 Tris-HCl tamponu ile 5 ml'lik fraksiyonlar peristaltik pompa vasıtasıyla toplandı. 280 nm dalga boyunda absorbands veremeyinceye kadar elüsyona devam edildi. Alınan fraksiyonlarda spektrofotometrede 280 nm dalga boyunda kantitatif protein tayini yapıldı. Absorbans veren tüplerde aktivite tayini yapıldı. Alkalen fosfataz aktivitesi gösteren tüpler birleştirildi ve 2 mM $MgCl_2$ içeren 0,01 (pH: 7,5) Tris-HCl tamponona karşı diyaliz edildi³⁵.

III. İ Periferel Alkalen Fosfataz Enzimi İçin Hazırlanan Homojenatın Sephadex G-200 Jel Filtrasyon Kolonu Yüklenmesi ve Elüsyon Alınması

198 ml homojenat Sephadex G-25 ile derişikleştirilip, önceden dengelenmiş kolona yüklendi. 2 mM MgCl₂ içeren 0,01 M pH: 7,5 Tris-HCl tamponu ile 5 ml'lik fraksiyonlar peristatik pompa vasıtasıyla toplandı. 280 nm dalga boyunda absorbands veremeyinceye kadar elüsyona devam edildi. Alınan fraksiyonlarda spektrofotometrede 280 nm dalga boyunda kantitatif protein tayini yapıldı. Absorbans veren tüplerde aktivite tayini yapıldı. Alkalen fosfataz aktivitesi gösteren tüpler birleştirildi ve 2 mM MgCl₂ içeren 0,01 (pH: 7,5) Tris-HCl tamponona karşı diyaliz edildi³⁵.

IV. İntegral Alkalen Fosfataz Enzimi İçin Hazırlanan Homojenatın Sephadex G-200 Jel Filtrasyon Kolonu Yüklenmesi ve Elüsyon Alınması

281 ml homojenat Sephadex G-25 ile derişikleştirilip, önceden dengelenmiş kolona yüklendi. 2 mM MgCl₂ içeren 0,01 M pH: 7,5 Tris-HCl tamponu ile 5 ml'lik fraksiyonlar peristatik pompa vasıtasıyla toplandı. 280 nm dalga boyunda absorbands veremeyinceye kadar elüsyona devam edildi. Alınan fraksiyonlarda spektrofotometrede 280 nm dalga boyunda kantitatif protein tayini yapıldı. Absorbans veren tüplerde aktivite tayini yapıldı. Alkalen fosfataz aktivitesi gösteren tüpler birleştirildi ve 2 mM MgCl₂ içeren 0,01 (pH: 7,5) Tris-HCl tamponona karşı diyaliz edildi³⁵.

2. 5. 6. c. Sephadex G-200 Kolonundan Elde Edilen Enzim zeltilerinin TEAE-Selüloz İyon Değişim Kolonuna Yüklenmesi ve Elüsyon Alınması

Hazırlanan jel kolona paketiendi. 2 M NaCl içeren 0,01 M (pH: 7,5) Tris-HCl tamponu ile yıkandı ve 0,01 M (pH: 7,5) Tris-HCl tamponu ile dengelendi.

I. Sephadex G-200 Jel Filtrasyon Kolonundan İzole Edilen Dış Periferal Alkalen Fosfataz Enzim Çözeltisinin TEAE-Selüloz İyon değişim Kolonuna Yüklenmesi ve Elüsyon Alınması

Sephadex G-200 kolonundan izole edilip, daha sonra 2 mM $MgCl_2$ içeren 0,01 M (pH: 7,5) Tris-HCl tamponuna karşı diyalizlenen dış periferal alkalen fosfataz enzim çözeltisi önceden dengelenmiş kolona tatbik edildi. Kolon 500 ml 2 mM $MgCl_2$ içeren 0,01 M (pH: 7,5) Tris-HCl tamponu ile yıkandı. Böylece net bir (-) yüke sahip olan proteinler kolona tutunmuş, diğer safsızlıklar da uzaklaştırılmış oldu. Daha sonra 0'dan 1 M'a NaCl ile gradient mixer vasıtasıyla sürekli bir konsantrasyon gradienti oluşturarak enzim elüe edildi. Peristaltik pompa vasıtasıyla akış hızı 80 ml/saat'e ayarlandı. 3'er ml'lik fraksiyonlar toplandı. Toplanan fraksiyonlarda 280 nm'de kantitatif protein tayini yapıldı. Absorbans gösteren tüplerde aktivite tayini yapıldı. Aktivite gösteren tüpler birleştirildi ve 2 mM $MgCl_2$ içeren 0,01 M (pH: 7,5) Tris-HCl tamponuna karşı diyaliz edildi³⁵.

II. Sephadex G-200 Jel Filtrasyon Kolonundan İzole Edilen Sitozolik Alkalen Fosfataz Enzim Çözeltisinin TEAE-Selüloz İyon değişim Kolonuna Yüklenmesi ve Elüsyon Alınması

Sephadex G-200 kolonundan izole edilip, daha sonra 2 mM $MgCl_2$ içeren 0,01 M (pH: 7,5) Tris-HCl tamponuna karşı diyalizlenen sitozolik alkalen fosfataz enzim çözeltisi önceden dengelenmiş kolona tatbik edildi. Kolon 300 ml 2 mM $MgCl_2$ içeren 0,01 M (pH: 7,5) Tris-HCl tamponu ile yıkandı. Böylece negatif yüke sahip olan proteinler kolona tutundu ve safsızlıklar yıkanarak uzaklaştırıldı. Daha sonra 0'dan 1 M'a NaCl ile gradient mixer vasıtasıyla sürekli bir konsantrasyon gradienti oluşturarak enzim elde edildi. Peristatik pompa vasıtasıyla akış hızı 80 ml/saat ayarlandı. 3'er ml'lik fraksiyonlar toplandı. Fraksiyonlarda 280 nm dalga boyunda kantitatif protein tayini yapıldı. Absorbans gösteren tüplerde aktivite tayini yapıldı. Aktivite gösteren tüpler birleştirildi ve 2 mM $MgCl_2$ içeren 0,01 M (pH: 7,5) Tris-HCl tamponuna karşı diyaliz edildi³⁵.

III. Sephadex G-200 Jel Filtrasyon Kolonundan İzole Edilen İç Periferal Alkalen Fosfataz Enzim Çözeltilisinin TEAE-Selüloz İyon değişim Kolonuna Yüklenmesi ve Elüsyon Alınması

Sephadex G-200 kolonundan izole edilip, daha sonra 2 mM $MgCl_2$ içeren 0.01 M (pH: 7,5) Tris-HCl tamponuna karşı diyalizlenen iç periferal alkalen fosfataz enzim çözeltisi önceden dengelenmiş kolona tatbik edildi. Kolon 350 ml 2 mM $MgCl_2$ içeren 0,01 M (pH: 7,5) Tris-HCl tamponu ile yıkandı. Daha sonra 0'dan 1 M'a NaCl ile gradient mixer vasıtasıyla sürekli bir konsantrasyon gradienti oluşturularak enzim elüe edildi. Peristatik pompa vasıtasıyla akış hızı 80 ml/saat'e ayarlandı. 3'er ml'lik fraksiyonlar toplandı. Toplanan fraksiyonlarda 280 nm dalga boyunda kantitatif protein tayini yapıldı. Absorbans gösteren tüplerde aktivite tayini yapıldı. Aktivite gösteren tüpler birleştirildi ve 2 mM $MgCl_2$ içeren 0,01 M (pH: 7,5) Tris-HCl tamponuna karşı diyaliz edildi³⁵.

IV. Sephadex G-200 Jel Filtrasyon Kolonundan İzole Edilen İntegral Alkalen Fosfataz Enzim Çözeltilisinin TEAE-Selüloz İyon değişim Kolonuna Yüklenmesi ve Elüsyon Alınması

Sephadex G-200 kolonundan izole edilip, daha sonra 2 mM $MgCl_2$ içeren 0.01 M (pH: 7,5) Tris-HCl tamponuna karşı diyalizlenen integral alkalen fosfataz enzim çözeltisi önceden dengelenmiş kolona tatbik edildi. Kolon 2 litre tampon ile yıkandı. Daha sonra bir konsantrasyon gradienti oluşturularak enzim elüe edildi. Peristatik pompa vasıtasıyla akış hızı 80 ml/saat'e ayarlandı. 3'er ml'lik fraksiyonlar toplandı. Toplanan fraksiyonlarda 280 nm dalga boyunda kantitatif protein tayini yapıldı. Absorbans gösteren tüplerde aktivite tayin yapıldı. Aktivite gösteren tüpler birleştirildi ve 2 mM $MgCl_2$ içeren 0,01 M Tris-HCl tamponuna karşı diyaliz edildi³⁵.

I. , II. , II. ve IV. elde edilen alkalen fosfataz enzim çözeltileri ile bütün kinetik çalışmalar ve elektroforez yapıldı.

2. 5. 7. Sodyumdodesilsülfat-Poliakrilamid Jel Elektrofözezi İle Enzim Saflığının Kontrolü

Enzim saflaştırılmasından sonra, iki farklı enzim konsantrasyonunun % 3-10 kesikli sodyumdodesilsülfat (SDS) poliakrilamid jel elektrofözezi Laemmli tarafından anlatıldığı gibi uygulanarak enzimin saflık derecesi kontrol edildi¹¹¹.

Bunun için elektroföze plakaları önce su ile sonra alkol ile iyice yıkandı. Plakaları birleştiren mikaların ince tabaka halinde vazelin sürüldü. İki cam plaka birbiri üzerine kondu ve poşetler geçirilerek jel hazırlama cihazına konularak sıkıştırıldı. Ayırma jeli hazırlanarak plakalar arasına enjektörle döküldü. Jel içine hava kabarcıkları olmamasına dikkat edildi. Jel yüzeyinin düzgün olması için % 1'lik SDS ile ince bir tabaka oluşturuldu. Katılaşınca kadar (yaklaşık yarım saat) bekledi. Katılaşınca üstündeki % 1'lik SDS döküldü. Daha sonra yığıma jeli üst yüzeye kadar ilave edildi. Üzerine dikkatlice tarak yerleştirildi. Tarağın üstüne nemli süzgeç kağıdı konularak 1 gece bekletildi. Ertesi gün tarak dikkatlice çıkarılarak plakalar elektroföze tankına yerleştirildi. Oluşan boşluklar işaretlenerek, jelin üstü önce saf su, sonra yürütme tamponu ile yıkandı. Elektroföze tankının alt ve üst kısmına yürütme tamponu konuldu.

Numuneler her birinden 20 µg olacak şekilde hazırlandı. Toplam hacim 100 ml olacak şekilde 1/1 oranında numune tamponu katıldı. 3 dakika su banyosunda inkübe edildi. Numuneler soğutulurak, enjektör yardımıyla yuvalara ekildi. Tank kapağı kapatılarak alt taraftan (+) kablo (anot), üstten (-) kablo (katot) yerleştirildi. Önce 80 volt'da yarım saat bekletildi. Daha sonra 150 volta ayarlanarak 4-5 saat oda sıcaklığında yürütüldü. Akım kesilerek, cam plakalar arasındaki jel dikkatlice çıkarıldı. Bu yürütme tamponu tekrar kullanılmak üzere özel kabına konuldu. Jel özel kabına konularak renklendirme çözeltisi üstünü dolduruncaya kadar dolduruldu. 1, 5-2 saat kadar çalkalayıcı üzerinde bırakıldı. Daha sonra renklendirme çözeltisinden çıkarılarak, renksizleştirme çözeltisine konuldu. Belirli aralarla değiştirilmek suretiyle jelin zemin rengi açılarak, protein bantları belirginleşinceye kadar 1-2 gün bu çözelti içinde çalkalandı. Renksizleştirme çözeltisi aktif karbon üzerinden geçirilerek tekrar tekrar kullanıldı. Jel, renksizleştirme çözeltisinden çıkartıldıktan sonra fotoğrafı çekildi.

Elektroforezde kullanılan renklendirme çözeltisi; 0,66 gr coomassie-blue R-250'nin 120 ml metanolde çözülmesi ve bunun üzerine 24 ml saf asetik asit ile 20 ml H₂O'nun ilavesi ile hazırlandı.

Renksizleştirme çözeltisi ise; % 7, 5 asetik asit, % 5 metanol ise % 87, 5 sudan ibarettir.

Ayırma jeli şöyle hazırlandı; 15 ml Tris-HCl (pH: 8,8), 13,2 ml % 30'luk akrilamid-% 0,8'lik bisakrilamid, 0,6 ml % 1'lik SDS, 0,4 ml % 5'lik TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletillen diamin) ve 9,4 ml su karıştırıldı. Bu karışımın üzerine en son olarak 0,8 ml % 1,5'lik amonyum persülfat [(NH₄)₂S₂O₈] (PER) ilave edildi.

Yığma jelinin hazırlanması ise şöyle yapıldı; 1 M'lik Tris-HCl'den 1,24 ml, % 30 akrilamid-% 0,8'lik bisakrilamid'den 1 ml, % 0,1'lik SDS'den 0,1 ml, % 5'lik TEMED'den 0,1 ml ve sudan 7,8 ml alınarak karıştırıldı. Son olarak yine günlük hazırlanmış, % 1,5'lik PER'den 0,2 ml ilave edildi.

2. 5. 8. Optimum pH'nın Belirlenmesi

Optimum pH çalışması alkalen fosfataz enziminin substratı p-nitrofenilfosfat ile yapıldı. 1 tablet p-nitrofenilfosfat 10 ml saf suda vortex yardımıyla çözülerek substrat çözeltisi hazırlandı. Diğer aktivite tayinleri için kullandığımız tabletlerde sadece tris tableti olduğu için 2.3. III. kısımda açıklandığı gibi pH: 3,5-11 aralığında üç farklı tampon çözeltiler hazırlandı. pH: 3,5-5,5 aralığında sodyum asetat, pH: 6-8,5 aralığında Tris-HCl ve pH: 9-11 aralığında ise glisin tamponu kullanıldı. Bu tampon çözeltilerde enzimin gösterdiği fosfataz aktivitesi spektrofotometrede ölçüldü ve sonuçlar grafik halinde verildi. Enzim çözeltisinin pH:'sı 3. 5, 4, 4. 5, 5. 5. 5, 6, 6. 5, 7, 7. 5, 8, 8. 5, 9. 9. 5, 10, 10. 5, 11'e 0, 1 NaOH ve 0,1 N HCl ile titre edildi.

Tayin işlemleri şu prosedüre göre yapıldı;

Her bir pH denemesi için bir numune ve bir kör olmak üzere iki şer tüp hazırlandı. Enzimli deneme için; tüpe pH'sı ayarlanmış 500 µl enzim ve aynı pH'daki tampondan 250 µl ilave edildi. Kör için; tüpe 500 µl enzimin içinde bulunduğu tampon ve 250 µl aynı pH'ya sahip tampondan ilave edildi. Reaksiyon her iki tüpe 250'şer µl substrat konularak başlatıldı. 30 dk sonunda spektrofotometrede 410 nm dalga boyunda köre karşı absorbans değeri okundu. Bütün pH denemeleri için substrat konulmadan bütün çözeltiler tüplerde hazırlandı. Daha sonra kör ve enzimli deneme tüpüne aynı anda olmak koşuluyla 1'er dakika arayla substrat konularak reaksiyon başlatıldı ve 30 dakika sonra 1'er dakika arayla 410 nm dalga boyunda köre karşı absorbans değerleri okundu.

2. 5. 9. Optimum Sıcaklığın Belirlenmesi

Antik insan kemiğinden saflaştırılan total AP ve Antik fil kemiğinden ayrı. ayrı saflaştırılan iç periferel, sitozolik, dış periferel ve integral AP izoenzimlerinin aktif oldukları sıcaklık aralığını ve optimum sıcaklığını belirlemek için p-nitrofenilfosfat subtrat olarak kullanılarak aktive tayini yapıldı. Prosedüre uygun olarak subtrat çözeltisi hazırlandı. Yapılan ölçümlerde enzim çözeltisinin sıcaklığı su banyosu yardımıyla 0°C ile 90°C arasında değiştirildi ve her 5°C'de bir aktivite ölçümü yapıldı.

Tayin işleminde şu prosedür takip edildi;

Her sıcaklık denemesi için bir numune ve bir de kör olmak üzere ikişer tüp hazırlandı. Numune için; sıcaklığı ayarlanmış 500 µl enzim ilave edildi. Kör için, enzimin içinde bulunduğu tampondan 500 µl konuldu. Her iki tüpe 500'er µl substrat çözeltisi ilave edilerek reaksiyon başlatıldı. 30 dk sonunda spektrofotometrede 410 nm dalga boyunda köre karşı absorbans değerleri okundu.

2. 5. 10. Jel Filtrasyon Kromatografisi ile Molekül Ağırlığının Tayini

Enzimler saflaştırıldıktan sonra jel filtrasyon kromatografisi kullanılarak molekül ağırlıkları tayin edildi.

Bunun için önce, Sephadex G-150 destile su içerisine 90°C'de 5 saat süreyle şişirildi. Hazırlanan jel bir huni vasıtasıyla (1,5 x 30 cm) kolona pakettendi. Kolon 24 saat süreyle 0,05 M Na₂HPO₄, 1 mM ditioeritritol, pH: 7,0 tamponu ile dengelendi. Dengelenme işlemine, kolonun altından alınan çözelti 280 nm'de absorbans vermeyinceye kadar devam edildi. Dengelenmiş olan kolona önce konsantrasyonu 0,2 mg/ml olacak şekilde standart protein yüklenerek 0,05 M Na₂HPO₄, 1 mM ditioeritritol, pH: 7,0 tamponu ile elüe edildi. Elüatlar 5 ml olacak şekilde alındı. Peristaltik pompa vasıtasıyla akış hızı 20 ml/saat olacak şekilde ayarlandı¹¹². Elüatların 280 nm'de absorbans değerleri belirlendi. Alınan sonuçlar grafik halinde verildi. Aynı şartlarda, dengelenmiş kolondan saf enzimler geçirilerek elüsyon alındı. Elüatların 280 nm'de absorbans değerleri belirlendi ve sonuçlar grafik halinde verildi.

2. 5. 11. V_{max} ve K_M Değerlerinin Belirlenmesi

Antik insan kemiklerinden saflaştırılan total alkalen fosfataz enzimi ve antik fıl kemiklerinden ayrı, ayrı saflaştırılan dış periferel, sitozolik, iç periferel ve integral alkalen fosfataz izoenzimlerinin maksimum hızını (V_{max}) ve hız sabiti (K_M)'yi belirlemek için p-nitrofenilfosfat substrat olarak kullanılarak aktivite tayinleri yapıldı. Artan substrat konsantrasyonuna karşın aktiviteyi bulmak için 5 farklı substrat konsantrasyonunda aktiviteler belirlendi. Birer tane tris ve p-nitrofenilfosfat tableti 20 ml saf suda vortex yardımıyla çözüldü. Bu amaçla yukarıda anlatıldığı gibi hazırlanan tamponlanmış substrat çözeltisinden sırasıyla beş tane tüpe 100 µl, 300 µl, 500 µl, 700 µl ve 900 µl alındı. Toplam hacim 1 ml olacak şekilde yukarıda anlatıldığı gibi hazırlanmış tampon çözeltisinden ilave edildi. Kör için, substrat konsantrasyonları aynı hazırlanıp, enzim çözeltisi yerine de 2 mM MgCl₂ içeren (pH: 7,5) 0,01 M Tris-HCl tamponu ilave edildi. Numune tüplerine 500 µl enzim çözeltisi konularak reaksiyon başlatıldı ve 30 dk sonra

köre karşı absorbands değerleri okundu. Bulunan değerlerden yararlanarak Lineweaver-Burk eğrileri çizildi.

Aktivite ölçümlerinde kullanılan ana substrat çözeltisi 4,6 mM olup aktivitede ölçüm ortamı 1,5 ml'ye seyreltildiğinden dolayı, ölçüm ortamlarında oluşan son substrat konsantrasyon değerleri 0,3 mM, 0,9 mM, 1,5 mM, 2,2 mM ve 2,8 mM olarak değişti. Reaksiyon hızı şöyle hesaplandı; 410 nm dalga boyunda p-nitrofenolat iyonunun molar absorpsiyon sabiti (ϵ) $1,84 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 'dir.¹¹³.

$$\text{p-nitrofenolat iyonunun miktarı} = \frac{A}{1,84 \times 10^4} \text{ M}$$

$$\text{p-nitrofenolat iyonunun miktarı} = \frac{A}{18,4} \text{ mM}$$

Bulunan değer 30 dakikada oluşan p-nitrofenolat iyonunun miktarı olduğundan dolayı 1 dakikada oluşan p-nitrofenolat iyonunun miktarı 30'a bölünerek bulunur. 0,5 ml enzim çözeltisi toplam hacim 1,5 ml'ye seyreltildiğinden dolayı 3 ile çarpılır;

$$\text{p-nitrofenolat iyonunun miktarı} = \frac{[A (\text{OD})] / 18,4}{30} \times 3 = \frac{A. (\text{OD}) \text{ M}}{184} \mu\text{mol /L. dak}$$

$$\text{EU} = \frac{A (\text{OD})}{184} \quad U = 5,4 \times (\text{OD}) \text{ mU}$$

Yukarıda anlatılan işlemler saflaştırılan her enzim için ayrı ayrı yapıldı ve her enzim için $V_{\max}$ ve K_M değerleri belirlendi. ve

2. 5. 12. Antik İnsan Kemiklerinden Elde Edilen Total Alkalen Fosfataz Enziminin ve Antik Fil Kemiklerinden Bağlanma Şekillerine Göre Saflaştırılan Dış Periteral, Sitolojik, İç Periferal ve İntegral Alkalen Fosfataz İzoenzimlerinin Aktiviteleri Üzerine Ca^{+2} İyonunun ve Tonocalsin Adlı İlacın Etkisi

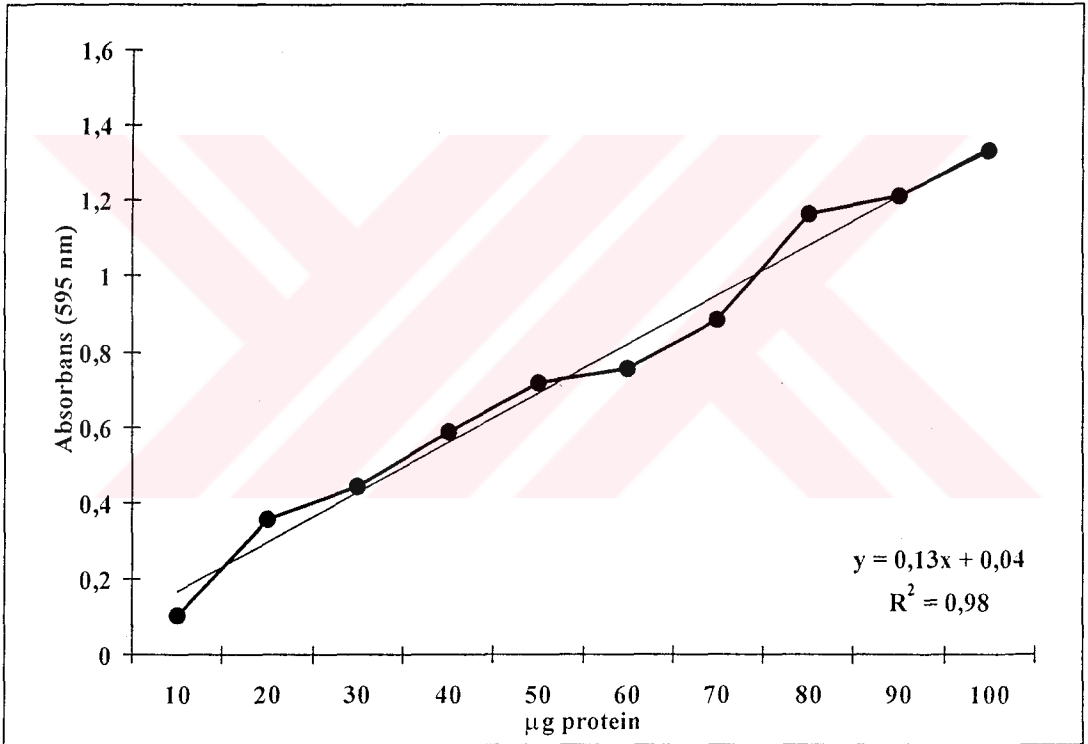
Antik insan ve fil kemiklerinden saflaştırılan alkalen fosfataz enzimlerinin aktiviteleri üzerine Ca^{+2} iyonunun etkisinin var olup olmadığı bir ön deneme ile araştırıldı. Daha sonra 10^{-2} M, 10^{-4} M ve 10^{-6} M olmak üzere Ca^{+2} iyonunun üç farklı konsantrasyonunda çözeltileri hazırlandı. Her konsantrasyon için ayrı ayrı 100 µl'den 400 µl'ye kadar çözelti alınarak alkalen fosfataz enzimi aktivitesi üzerine etkisi tespit edildi. Sonuçlar aktivite-µl inhibitör halinde grafik edildi.

Saflaştırılan bu enzimlerin aktiviteleri üzerine kemik erimesi hastalığının tedavisinde kullanılan tonocalsin adlı ilacın etkisinin olup olmadığı araştırıldı. Ön denemelerle hangi konsantrasyonlarda enzimlerin aktivitelerini değiştirdiği tespit edildi. Daha sonra 10 IU/ml, 1 IU/ml ve 0,1 IU/ml olmak üzere tonocalsininin üç farklı konsantrasyonda çözeltileri hazırlandı. Her konsantrasyon için ayrı ayrı 100 µl'den 400 µl'ye kadar çözelti alınarak alkalen fosfataz enzimi aktivitesi üzerine etkisi belirlendi. Sonuçlar aktivite-µl inhibitör olarak grafik edildi.

3. SONUÇLAR

3. 1. Kantitatif Protein Tayini İçin Hazırlanan Standart Eğri

Kantitatif protein tayininde coomassie-blue yöntemi kullanıldı. Coomassie-blue yöntemi için önce standart bir eğri hazırlandı. Antik insan ve fil kemikleri için hazırlanan homojenatlarda ve saflaştırılan enzim çözeltilerindeki protein miktarı bu eğriye göre belirlendi. Standart çözeltideki mikrogram proteine karşılık gelen absorbans değerleri 3. 1.'de gösterilmiştir.



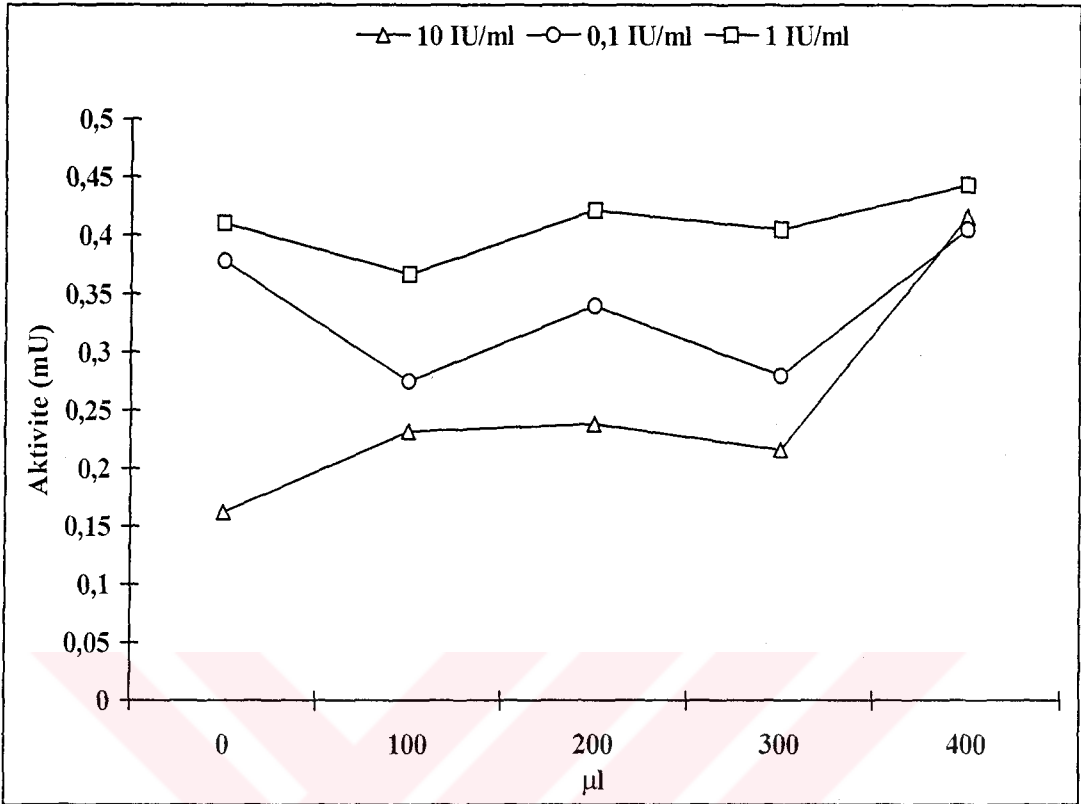
Şekil 3.1. Coomassie-blue yöntemi ile protein tayini için kullanılan standart grafik.

3. 2. Antik İnsan Kemiklerinden Total Olarak Saflaştırılan Alkalen Fosfataz Enziminin Sephadex G-200 Jel Filtrasyon ve TEAE-Selüloz İyon Değişim Kromatografisi ile Saflaştırma Sonuçları

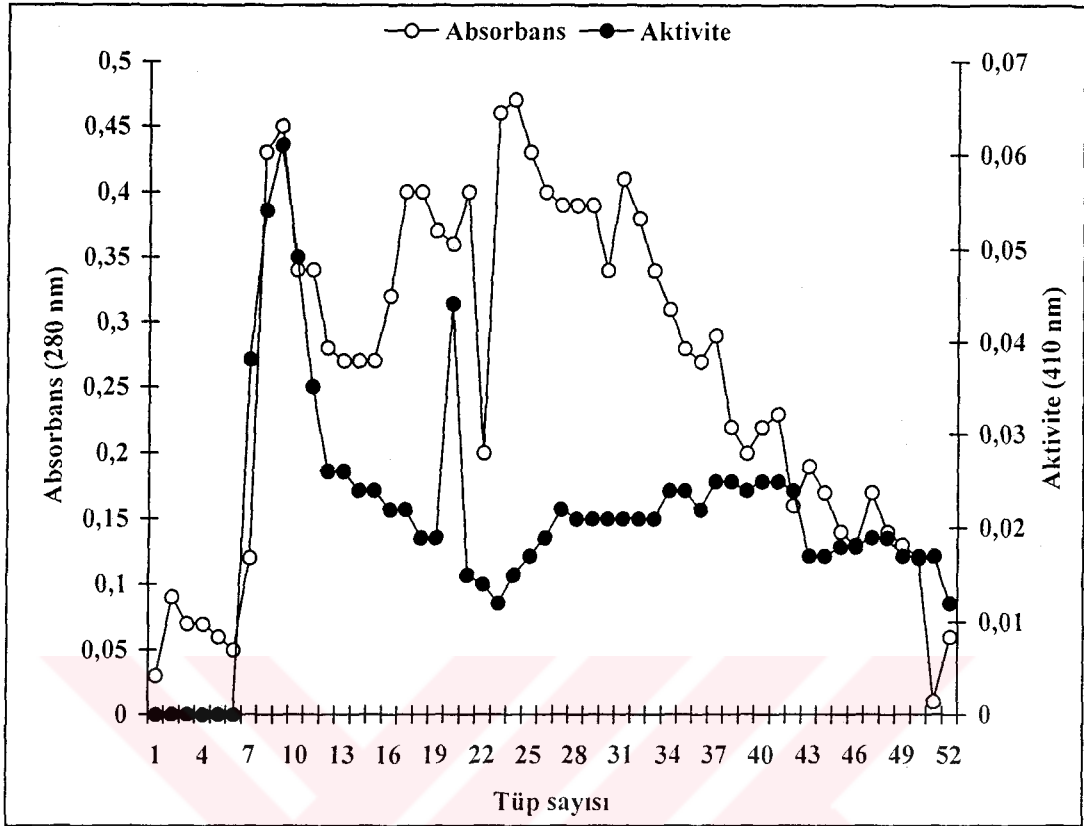
Enzim saflaştırma işlemlerine geçilmeden önce kolon materyali hazırlandı. Jel bir gece oda sıcaklığında şişirilip kolona paketleni ve birkaç gün tamponla dengelendi. Hazırlanan homojenat bütanol ekstraksiyon basamağından sonra Sephadex G-200 jel filtrasyon kolona tatbik edildi ve 2 mM MgCl₂ içeren 0,01M (pH: 7,5) Tris-HCl tamponu ile elüe edildi. Elüatlar 5'er ml'lik fraksiyonlar halinde toplanarak her tüpteki numune için 280 nm'de kantitatif protein tayini yapıldı. Absorpsiyon gösteren fraksiyonların aktivite ölçümleri yapılarak aktivite gösteren fraksiyonlar birleştirildi ve bir sonraki saflaştırma basamağında kullanıldı. Sonuçlar grafik olarak gösterildi.

Jel filtrasyon kolonundan elde edilen enzim havuzu TEAE-selüloz iyon değişim kolonuna yüklenerek saflaştırıldı. Saflaştırma işlemine geçilmeden önce 0,5 M HCl çözeltisi ile kuru jel aktif hale getirilip, 0,5 M NaOH çözeltisi ile nötürleştirildi ve kolona paketleni. 2 mM MgCl₂ içeren 0,01 M Tris-HCl (pH: 7,5) tamponu ile kolon dengelendi. Enzim kolona yüklendi ve aynı tampon içinde 0'dan 1M'a NaCl ile gradient mixer vasıtasıyla sürekli konsantrasyon gradienti oluşturularak elüe edildi. Elüsyonlar 3 ml'lik fraksiyonlar halinde toplanarak her tüpteki numune için 280 nm'de kantitatif protein tayini yapıldı. Absorpsiyon gösteren fraksiyonların aktivite ölçümleri yapıldı ve aktivite gösteren fraksiyonlar birleştirildi. Sonuçlar grafik olarak gösterildi.

Antik insan kemiklerinden saflaştırılan alkalen fosfataz enziminin Sephadex G-200 jel filtrasyon kolonu sonucu Şekil 3. 2. a.'da, TEAE-selüloz iyon değişim sonuçları Şekil 3. 2. b.'de verilmiştir.



Şekil 3.2.a. Sephadex G-200 jel filtrasyon kolonu kullanılarak insan kemiklerinden saflaştırılan alkalen fosfataz enziminin 2 mM $MgCl_2$ içeren 0,01 M (pH: 7,5) Tris-HCl tamponuyla elüsyonu; kolon 1,5 x 30 cm, jel yüksekliği 23 cm, elüsyon hızı 20 ml/saat ve fraksiyon hacmi 5 ml.



Şekil 3.2.b. TEAE-selüloz iyon değişim kolonu kullanılarak insan kemiklerinden saflaştırılan alkalen fosfataz enziminin 2 mM $MgCl_2$ içeren 0,01 M (pH: 7,5) Tris-HCl tamponu içinde 0'dan 1 M'a NaCl ile sürekli bir konsantrasyon gradienti oluşturularak elüsyonu; kolon 1,5 x 30 cm, jel yüksekliği 20 cm, elüsyon hızı 80 ml/saat ve fraksiyon hacmi 3 ml.

Antik insan kemiklerinden 2. 5. 5. a.'da anlatıldığı gibi homojenat elde edildi. Elde edilen homojenattan 0,5 ml alınarak 2. 5. 2.'de anlatıldığı gibi aktivite tayini, 0,1 ml alınarak 2. 5. 1. b.'deki anlatıldığı gibi coomassie-blue yöntemiyle protein tayini yapıldı. Mililitre homojenat için protein miktarı 0,16 mg/ml ve aktivitesi 4,27 mU/ml bulundu.

Homojenat için spesifik aktivite ise; $0,16/4,27$: 0,037 mU/mg protein olarak hesaplandı.

Sephadex G-200 jel filtrasyon kolonu kullanılarak yapılan saflaştırma işlemi sonucunda (14-25) nolu tüpler birleştirilerek aktivite tayini ve coomassie-blue yöntemiyle protein tayini yapıldı. Protein miktarı 0,23 mg/ml ve aktivitesi 0,363 mU/ml olarak bulundu.

Sephadex G-200 jel filtrasyon kolonundan elde edilen enzim havuzunun spesifik aktivitesi ; $0,363/0,23$: $1,57$ mU/mg protein olarak hesaplandı.

Bu değerlere göre enzimin Sephadex G-200 jel filtrasyon kolona uygulanması sonucu $1,57/0,037$: $42,6$ kat saflaştırılmış oldu.

II. Saflaştırma basamağı olan TEAE-selüloz iyon değişim kolonu kullanılarak yapılan saflaştırma işlemi sonucunda (7-21) nolu tüpler birleştirilerek aktivite tayini ve coomassie-blue yöntemiyle protein tayini yapıldı. Protein miktarı $0,12$ mg/ml ve aktivitesi $0,410$ mU/ml olarak bulundu.

II. Saflaştırma basamağı olan TEAE-selüloz iyon değişim kolonundan elde edilen enzim havuzunun spesifik aktivitesi ise; $0,410/0,12$: $3,4$ mU/mg protein olarak hesaplandı.

Bu değerlere göre enzim II. basamak saflaştırma işlemi sonucu $3,4/0,037$: $92,34$ kat saflaştırılmış oldu. Sonuçlar Tablo 3. 1.'de gösterildi.

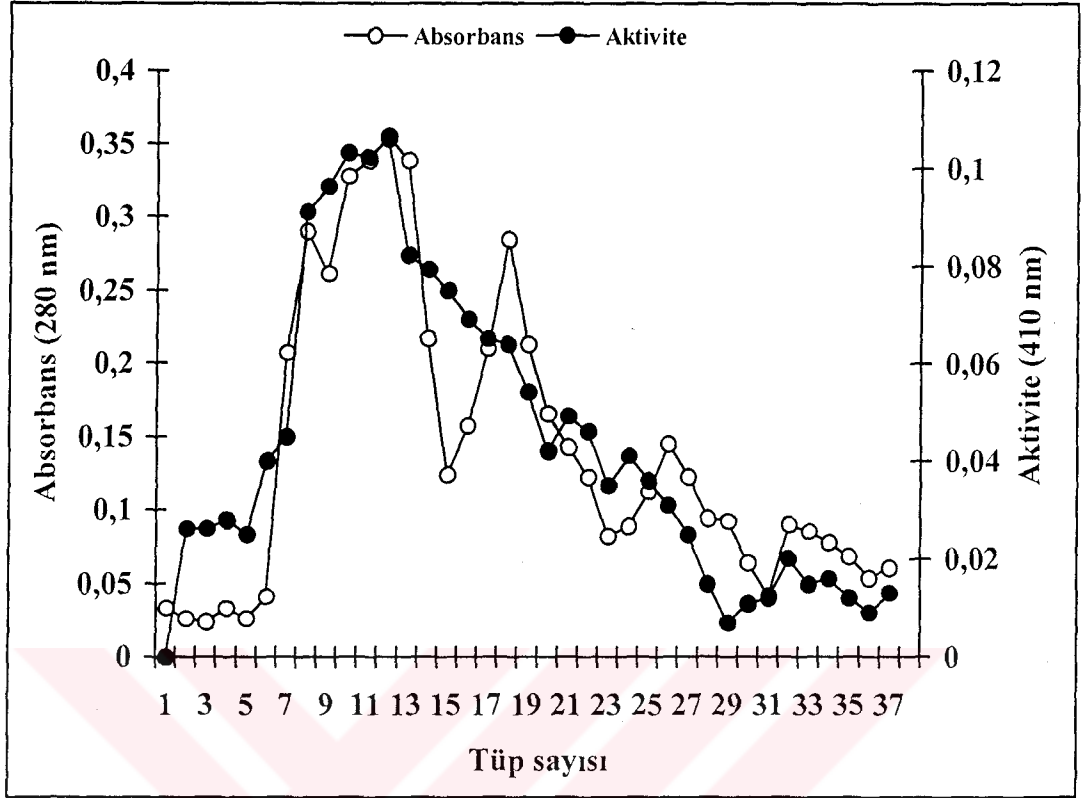
Tablo 3.1. Antik insan kemiklerinden elde edilen alkalen fosfataz enzim homojenatında enzim ünitesi, spesifik aktivite ve Sephadex G-200 jel filtrasyon ve TEAE-selüloz iyon değişim kolonundan saflaştırılan alkalen fosfataz enzim havuzunda enzim ünitesi, spesifik aktivite ve saflaştırma sonuçları.

Basamaklar	Hacim (ml)	Aktivite (mU/ml)	Total Aktivite MU	%	Protein (mg/ml)	Spesifik Aktivite (mU/mg)	Saflaştırma Oranı
Homojenat	200	0,16	32	100	4,27	0,037	-
Sephadex G-200	55	0,363	19,96	62	0,23	1,57	42,6
TEAE-selüloz	35	0,410	14,36	45	0,12	3,40	92,34

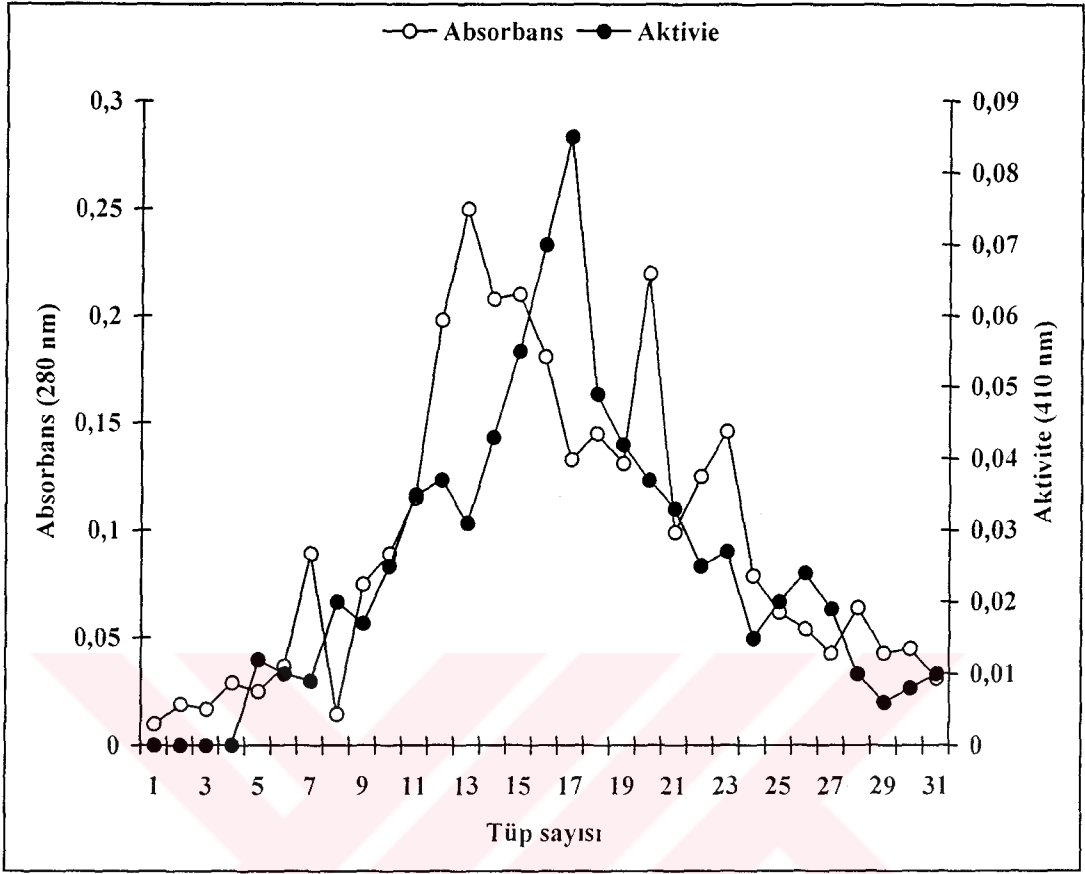
3. 3. Antik Fil Kemiğinden Dış Periferal, Sitozolik, İç Periferal ve İntegral Alkalen Fosfataz Enzimlerinin Sephadex G-200 Jel Filtrasyon ve TEAE-Selüloz İyon Değişim Kromatografisi ile Saflaştırma Sonuçları

Enzim saflaştırma işlemlerine geçilmeden 2. 5. 4.'de anlatıldığı gibi kolon hazırlandı. Homojenatlar kolona direkt olarak tatbik edildi. 2 mM $MgCl_2$ içeren 0,01M (pH: 7,5) Tris-HCl tamponu ile elüe edildi. Elüatlar 5'er ml'lik fraksiyonlar halinde toplanarak her tüpteki numune için 280 nm'de kantitatif protein tayini yapıldı. Absorpsiyon gösteren fraksiyonların aktivite ölçümleri yapılarak aktivite gösteren fraksiyonlar birleştirildi ve bir sonraki saflaştırma basamağında kullanıldı. Sonuçlar grafik olarak gösterildi.

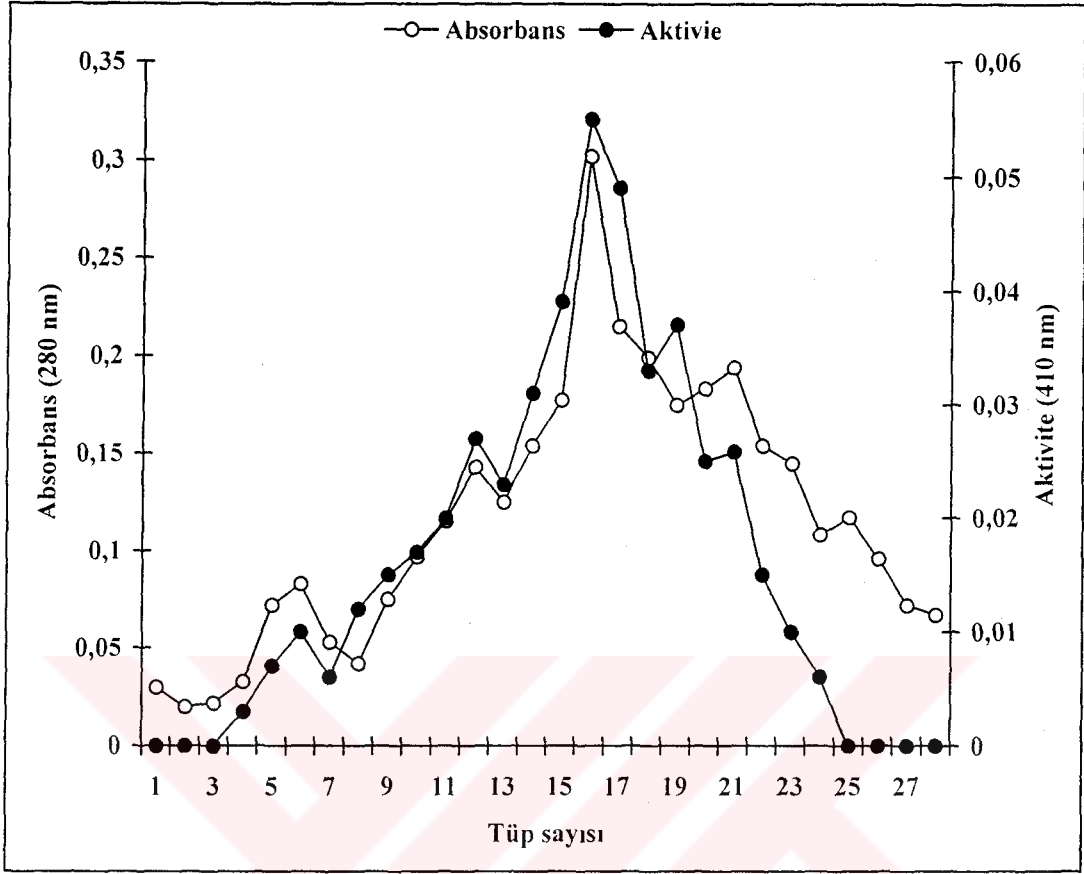
Antik fil kemiğinden Sephadex G-200 jel filtrasyon kromatografisi ile ayrı, ayrı saflaştırılan alkalen fosfataz enzimlerinden, dış periferal alkalen fosfataz enziminin saflaştırma işleminin sonucu Şekil 3. 3. a.'da, sitozolik alkalen fosfataz enziminin saflaştırma işleminin sonucu Şekil 3. 3. b.'de, iç periferal alkalen fosfataz enziminin saflaştırma işleminin sonucu Şekil 3. 3. c.'de, integral alkalen fosfataz enziminin saflaştırma işleminin sonucu Şekil 3. 3. d.'de verilmiştir.



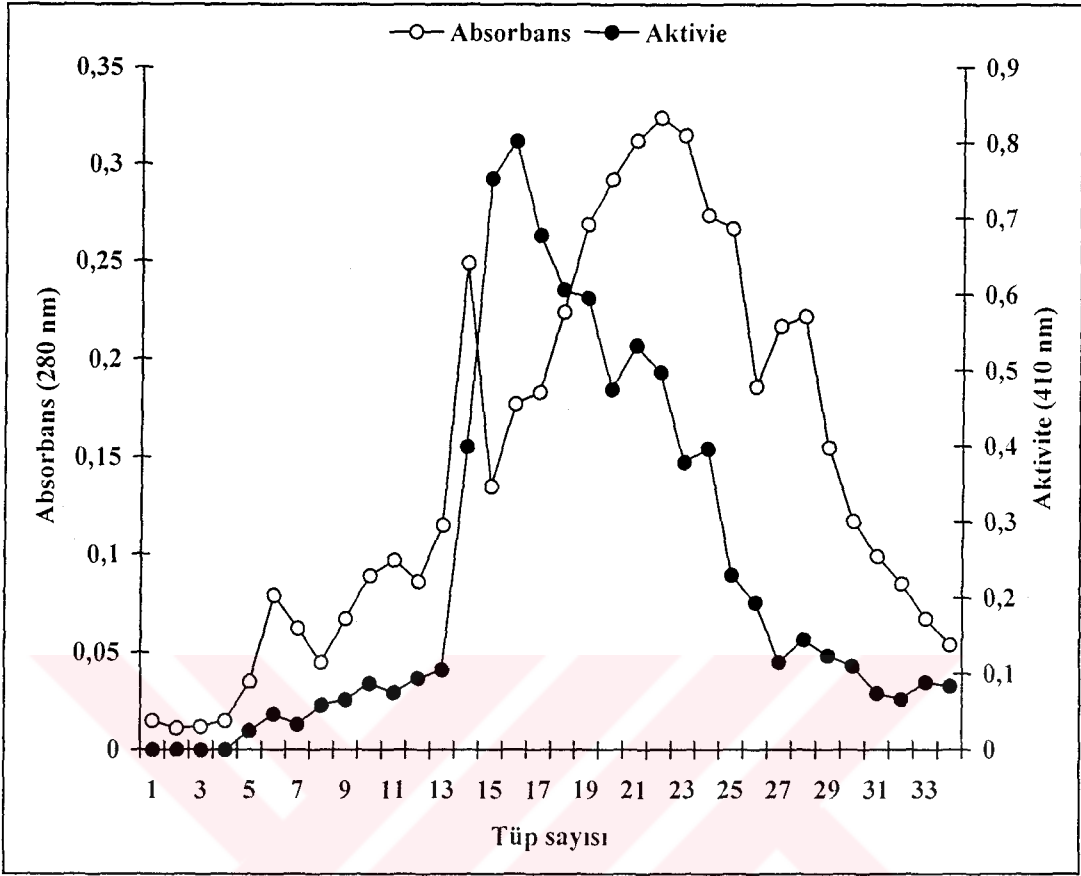
Şekil 3.3.a. Sephadex G-200 jel filtrasyon kolonu kullanılarak fil kemiklerinden saflaştırılan dış periferik alkalik fosfat enziminin 2 mM $MgCl_2$ içeren 0,01 M (pH: 7,5) Tris-HCl tamponuyla elüsyonu; kolon 1,5 x 30 cm, jel yüksekliği 23 cm, elüsyon hızı 20 ml/saat ve fraksiyon hacmi 5 ml.



Şekil 3.3.b. Sephadex G-200 jel filtrasyon kolonu kullanılarak fil kemiklerinden saflaştırılan sitozolik alkalen fosfataz enziminin 2 mM $MgCl_2$ içeren 0,01 M (pH: 7,5) Tris-HCl tamponuyla elüsyonu; kolon 1,5 x 30 cm, jel yüksekliği 23 cm, elüsyon hızı 20 ml/saat ve fraksiyon hacmi 5 ml.



Şekil 3.3.c. Sephadex G-200 jel filtrasyon kolonu kullanılarak fil kemiklerinden saflaştırılan iç periferik alkalen fosfataz enziminin 2 mM $MgCl_2$ içeren 0,01 M (pH: 7,5) Tris-HCl tamponuyla elüsyonu; kolon 1,5 x 30 cm, jel yüksekliği 23 cm, elüsyon hızı 20 ml/saat ve fraksiyon hacmi 5 ml.

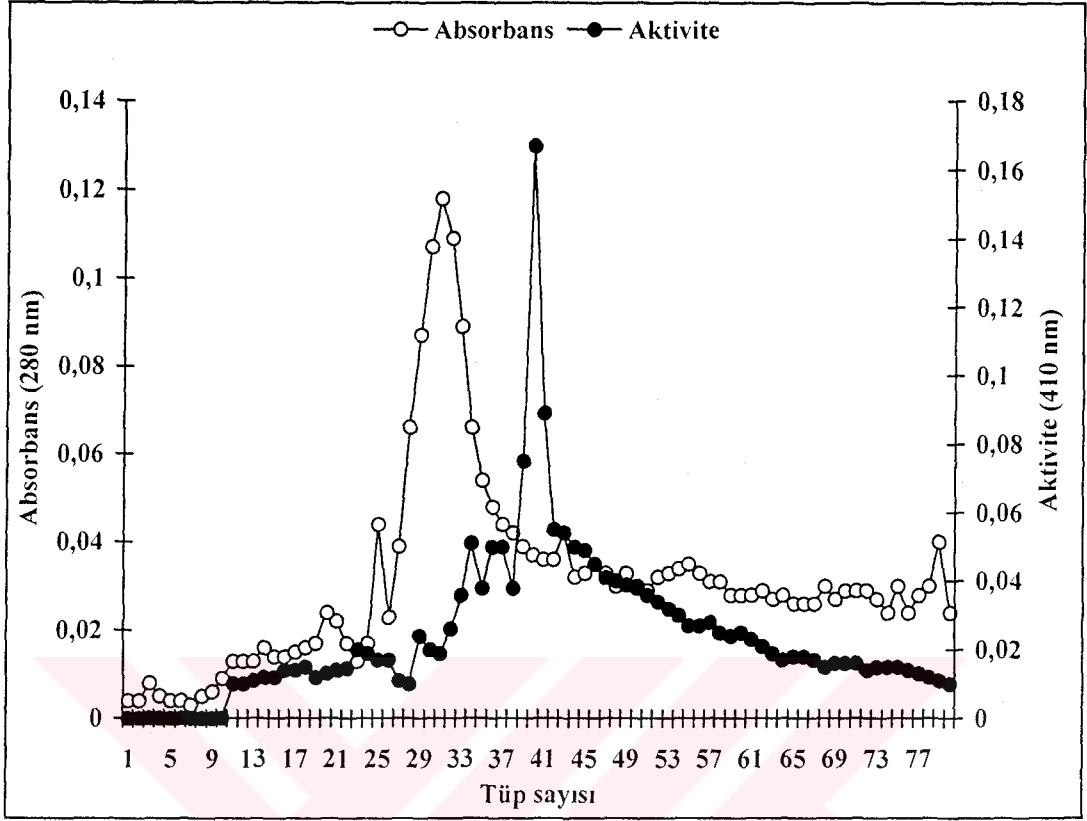


Şekil 3.3.d. Sephadex G-200 jel filtrasyon kolonu kullanılarak fil kemiklerinden saflaştırılan integral alkalen fosfataz enziminin 2 mM $MgCl_2$ içeren 0,01 M (pH: 7,5) Tris-HCl tamponuyla elüsyonu; kolon 1,5 x 30 cm, jel yüksekliği 23 cm, elüsyon hızı 20 ml/saat ve fraksiyon hacmi 5 ml.

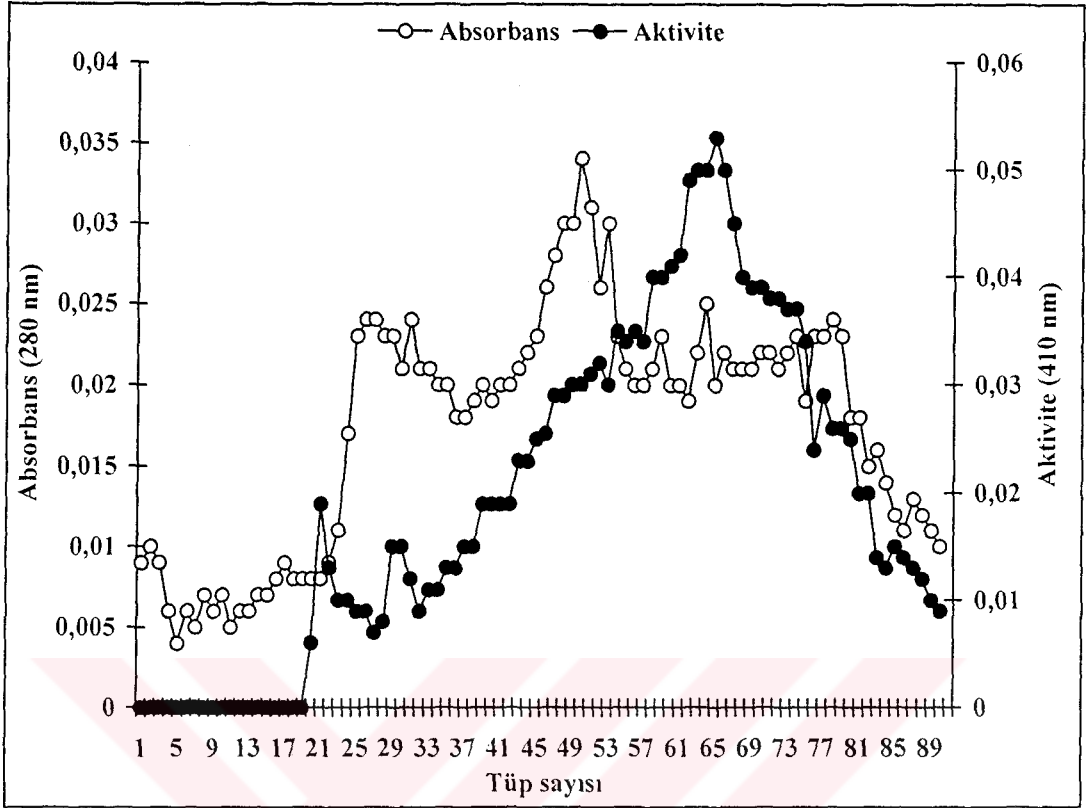
Jel filtrasyon kolonundan izole edilen enzim çözeltileri TEAE-selüloz kolonuna yüklenerek saflaştırıldı. 2. 5. 3.'de anlatıldığı gibi hazırlanan kolona diyalinlenmiş enzim çözeltileri tatbik edildi. 2 mM $MgCl_2$ içeren 0,01 M Tris-HCl (pH: 7,5) tamponu ile yıkandı ve aynı tampon içinde 0'dan 1M'a NaCl ile gradient mixer vasıtasıyla sürekli bir konsantrasyon gradienti oluşturularak elüe edildi. Elüsyonlar 3 ml'lik fraksiyonlar halinde toplanarak her tüpteki numune için 280 nm'de kantitatif protein tayini yapıldı. Absorpsiyon gösteren fraksiyonlarda aktivite ölçümleri yapıldı. Aktivite gösteren tüpler birleştirildi. Sonuçlar grafik olarak gösterildi.

II. saflaştırma basamağı olan TEAE-selüloz iyon değişim kromatografisi ile ayrı ayrı saflaştırılan alkalen fosfataz enzimlerinden, dış periferel alkalen fosfataz enziminin saflaştırma işleminin sonucu şekil 3. 3. e.'da, sitozolik alkalen fosfataz enziminin saflaştırma işleminin sonucu şekil 3. 3. f.'de, iş periferel alkalen fosfataz enziminin saflaştırma işleminin sonucu şekil 3. 3. g.'de, integral alkalen fosfataz enziminin saflaştırma işleminin sonucu şekil 3. 3. h.'de verilmiştir.

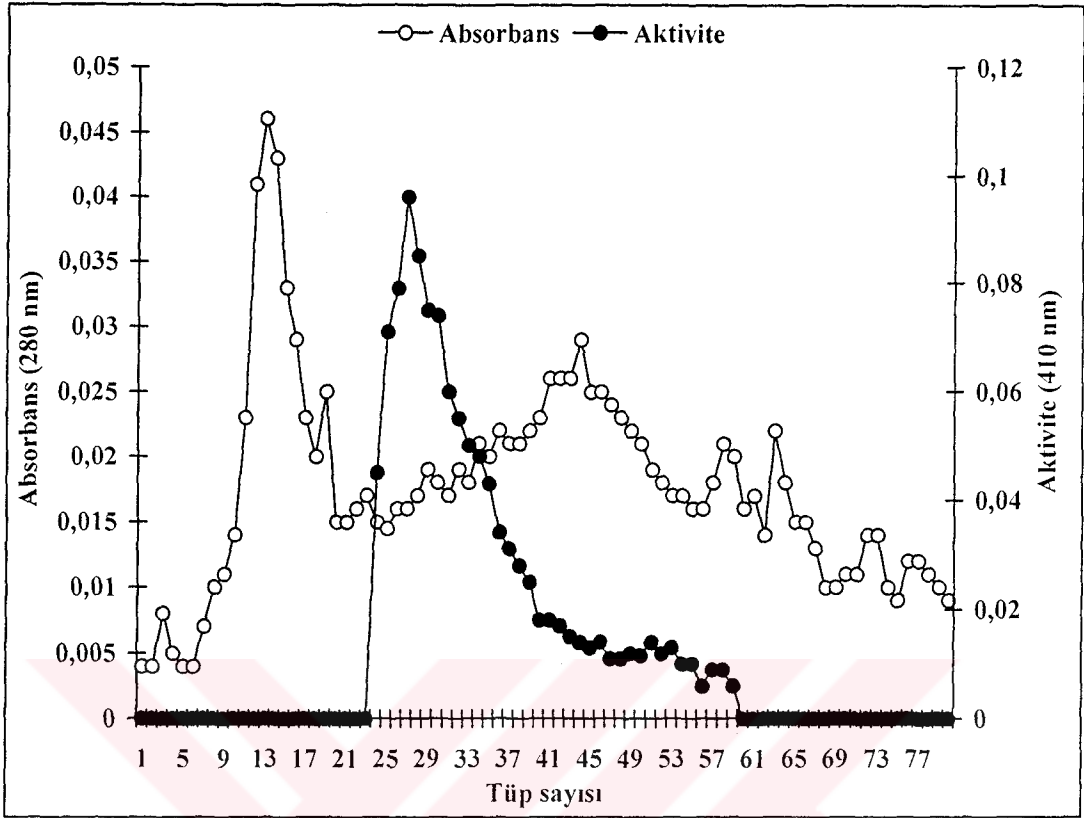




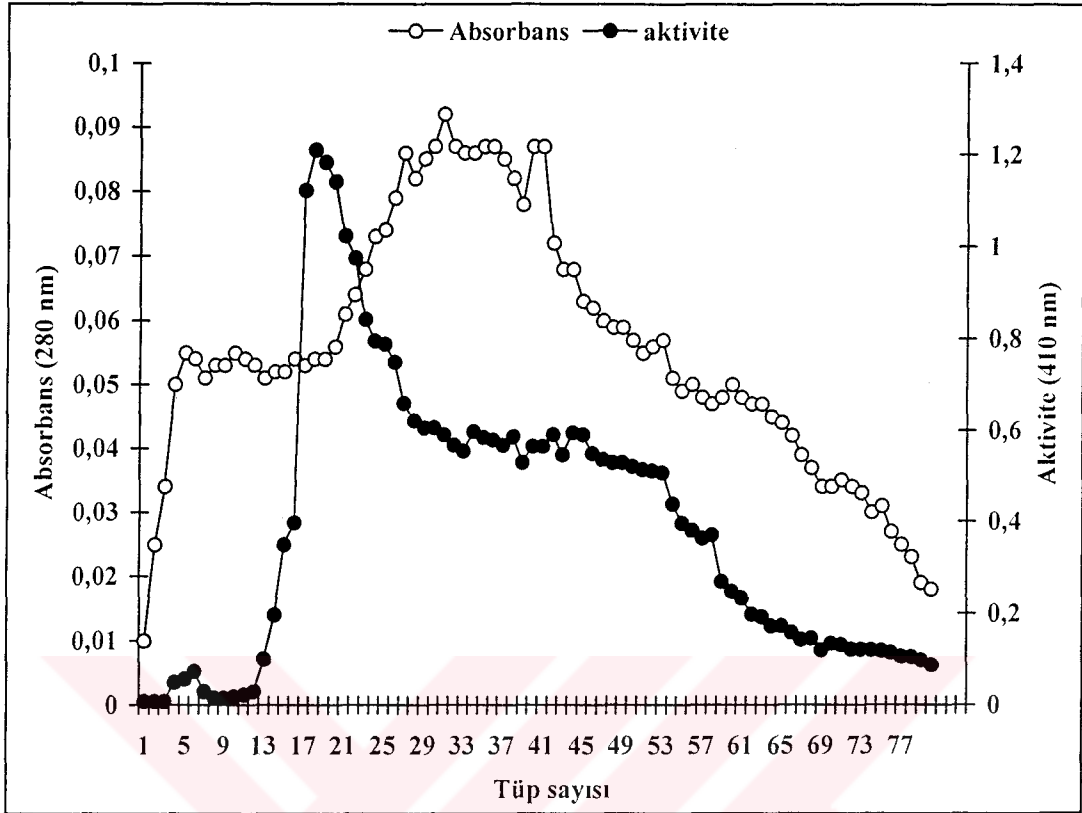
Şekil 3.3.e. TEAE-selüloz iyon değişim kolonu kullanılarak fil kemiklerinden saflaştırılan dış periferik alkalen fosfataz enziminin 2 mM $MgCl_2$ içeren Tris-HCl tamponu içinde 0'dan 1M'a NaCl ile sürekli bir konsantrasyon gradienti oluşturularak elüsyonu; kolon 1,5 x 30 cm, jel yüksekliği 20cm, elüsyon hızı 80 ml/saat ve fraksiyon hacmi 3 ml.



Şekil 3.3.f. TEAE-selüloz iyon değişim kolonu kullanılarak fil kemiklerinden saflaştırılan sitozolik alkalen fosfataz enziminin 2 mM $MgCl_2$ içeren Tris-HCl tamponu içinde 0'dan 1M'a NaCl ile sürekli bir konsantrasyon gradienti oluşturularak elüsyonu; kolon 1,5 x 30 cm, jel yüksekliği 20 cm, elüsyon hızı 80 ml/saat ve fraksiyon hacmi 3 ml.



Şekil 3.3.g. TEAE-selüloz iyon değişim kolonu kullanılarak fıl kemiklerinden saflaştırılan iç periferik alkalen fosfataz enziminin 2 mM $MgCl_2$ içeren Tris-HCl tamponu içinde 0'dan 1 M'a NaCl ile sürekli bir konsantrasyon gradienti oluşturularak elüsyonu; kolon 1,5 x 30 cm, jel yüksekliği 20cm, elüsyon hızı 80 ml/saat ve fraksiyon hacmi 3 ml.



Şekil 3.3.g. TEAE-selüloz iyon değişim kolonu kullanılarak fil kemiklerinden saflaştırılan integral alkalen fosfataz enziminin 2 mM $MgCl_2$ içeren Tris-HCl tamponu içinde 0'dan 1 M'a NaCl ile sürekli bir konsantrasyon gradienti oluşturularak elüsyonu; kolon 1,5 x 30 cm, jel yüksekliği 20cm, elüsyon hızı 80 ml/saat ve fraksiyon hacmi 3 ml.

Antik fil kemiklerinden 2. 5. 6. a. I.'de anlatıldığı gibi dış periferik alkalen fosfataz enzim homojenatı elde edildi. Elde edilen bu homojenattan 0,5 ml alınarak 2. 5. 2.'de anlatıldığı gibi aktivite tayini, 0,1 ml alınarak 2. 5. 1. b.'de anlatıldığı gibi coomassie-blue yöntemiyle protein tayini yapıldı. Mililitre homojenat için protein miktarı 1,72 mg/ml ve aktivitesi 0,508 mU/ml olarak bulundu.

Spesifik aktivitesi ise ; $0,508/1,72$: 0,29 mU/mg protein olarak bulundu.

Sephadex G-200 jel filtrasyon kolonu kullanılarak yapılan saflaştırma işlemi sonucunda (8-16) nolu tüpler birleştirilerek aktivite tayini ve coomassie-blue yöntemiyle protein tayini yapıldı. Protein miktarı 0,099 mg/ml ve aktivitesi 1,408 mU/ml olarak bulundu.

Sephadex G-200 jel filtrasyon kolonundan elde edilen enzim havuzunun spesifik aktivitesi ; $1,408/0,099$: 14,22 mU/mg protein olarak hesaplandı.

Bu değerlere göre enzimin Sephadex G-200 jel filtrasyon kolona uygulanması sonucu $14,22/0,29$: 48,9 kat saflaştırılmış oldu.

II. saflaştırma basamağı olan TEAE-selüloz iyon değişim kolonu kullanılarak yapılan saflaştırma işlemi sonucunda (34-46) nolu tüpler birleştirilerek aktivite tayini ve coomassie-blue yöntemi ile protein tayini yapıldı. Protein miktarı 0,073 mg/ml ve aktivite 1,717 mU/ml olarak bulundu.

II. saflaştırma basamağı olan TEAE-selüloz iyon değişim kolonundan elde edilen enzim havuzunun spesifik aktivitesi ise; $1,717/0,073$: 23,52 mU/mg protein olarak bulundu.

Bu değerlere göre II. basamak saflaştırma işlemi sonucu $23,52/0,29$: 81,1 kat saflaştırılmış oldu.

Yapılan bu çalışma tüm hesaplamalarda kullanılarak sonuçlar Tablo 3. 2.'de gösterildi.

Antik fil kemiklerinden 2. 5. 6. a. II. , III. , IV.'de anlatıldığı gibi homojenatlar elde edildi. Elde edilen bu homojenatlardan 0,5 ml alınarak 2. 5. 2.'de anlatıldığı gibi aktivite tayini, 0,1 ml alınarak 2. 5. 1. b.'de anlatıldığı gibi coomassie-blue yöntemiyle protein tayini yapıldı. Mililitre homojenat için protein miktarları ve aktiviteleri yukarıdaki gibi hesaplandı.

Sephadex G-200 jel filtrasyon kolonu kullanılarak yapılan saflaştırma işlemi sonunda sitozolik AP enzimi için (10-19) nolu tüpler, iç periferik AP enzimi için (12-21) nolu

tüpler ve integral AP enzimi için (15-27) nolu tüpler birleştirilerek aktivite tayini ve coomassie-blue yöntemiyle protein tayini yukarıda anlatıldığı gibi yapıldı.

II. saflaştırma basamağı TEAE-selüloz iyon değişim kolonu kullanılarak yapılan saflaştırma işlemi sonunda sitozolik AP enzimi için (58-74) nolu tüpler, iç periferel AP enzimi için (24-39) nolu tüpler ve integral AP enzimi için (17-44) nolu tüpler birleştirilerek aktivite tayini ve coomassie-blue yöntemiyle protein tayini yukarıda anlatıldığı gibi yapıldı.

Bulunan değerlere göre homojenatların önce Sephadex G-200 jel filtrasyon kolonuna, sonra TEAE-selüloz iyon değişim kolonuna uygulanması sonucu kaç kat saflaştırma yapıldığı hesaplandı. Sonuçlar Tablo 3. 3. , Tablo 3. 4. ve Tablo 3. 5.'de gösterildi.

Tablo 3.2. Antik fil kemiklerinden elde edilen dış periferel alkalen fosfataz enzim homojenatında enzim ünitesi, spesifik aktivite ve Sephadex G-200 jel filtrasyon ve TEAE-selüloz iyon değişim kolonundan saflaştırılan alkalen fosfataz enzim havuzunda enzim ünitesi, spesifik aktivite ve saflaştırma sonuçları.

Basamaklar	Hacim (ml)	Aktivite (mU/ml)	Total Aktivite mU	%	Protein (mg/ml)	Spesifik Aktivite (mU/mg)	Saflaştırma Oranı
Homojenat	156	0,508	79,24	100	1,72	0,29	-
Sephadex G-200	41	1,408	57,73	73	0,099	14,22	48,9
TEAE-selüloz	30	1,717	51,51	65	0,073	23,52	81,1

Tablo 3.3. Antik fil kemiklerinden elde edilen sitozolik alkalen fosfataz enzim homojenatında enzim ünitesi, spesifik aktivite ve Sephadex G-200 jel filtrasyon ve TEAE-selüloz iyon değişim kolonundan saflaştırılan alkalen fosfataz enzim havuzunda enzim ünitesi, spesifik aktivite ve saflaştırma sonuçları.

Basamaklar	Hacim (ml)	Aktivite (mU/ml)	Total Aktivite		Protein (mg/ml)	Spesifik Aktivite (mU/mg)	Saflaştırma Oranı
			mU	%			
Homojenat	165	0,187	30,85	100	1,24	0,15	-
Sephadex G-200	54	0,485	26,22	85	0,084	5,74	38,26
TEAE-selüloz	42	0,574	24,11	78	0,05	11,48	76,5

Tablo 3.4. Antik fil kemiklerinden elde edilen iç periferik alkalen fosfataz enzim homojenatında enzim ünitesi, spesifik aktivite ve Sephadex G-200 jel filtrasyon ve TEAE-selüloz iyon değişim kolonundan saflaştırılan alkalen fosfataz enzim havuzunda enzim ünitesi, spesifik aktivite ve saflaştırma sonuçları.

Basamaklar	Hacim (ml)	Aktivite (mU/ml)	Total Aktivite		Protein (mg/ml)	Spesifik Aktivite (mU/mg)	Saflaştırma Oranı
			mU	%			
Homojenat	198	0,061	12,11	100	1,08	0,056	-
Sephadex G-200	48	0,206	9,93	82	0,072	2,83	50,53
TEAE-selüloz	36	0,248	8,93	3	0,065	3,81	68,04

Tablo 3.5. Antik fil kemiklerin den elde edilen integral alkalen fosfataz enzim homojenatında enzim ünitesi, spesifik aktivite ve Sephadex G-200 jel filtrasyon ve TEAE-selüloz iyon değişim kolonundan saflaştırılan alkalen fosfataz enzim havuzunda enzim ünitesi, spesifik aktivite ve saflaştırma sonuçları.

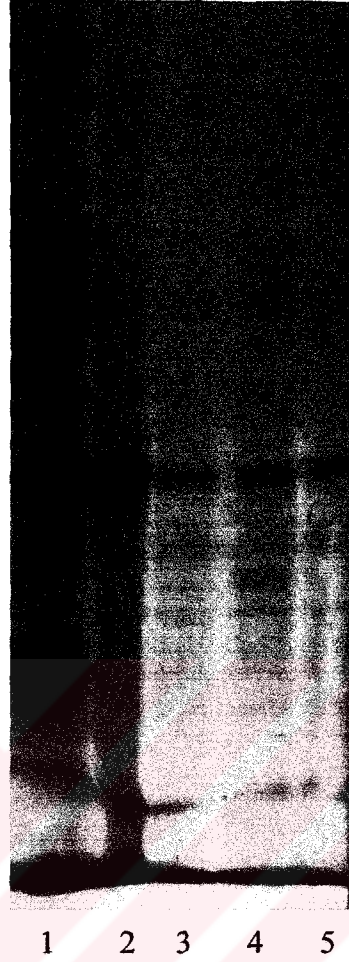
Basamaklar	Hacim (ml)	Aktivite (mU/ml)	Total Aktivite MU	%	Protein (mg/ml)	Spesifik Aktivite (mU/mg)	Saflaştırma Oranı
Homojenat	281	1,699	477,80	100	1,57	1,082	-
Sephadex G-200	57	4,77	272,30	57	0,11	43,36	42,1
TEAE-selüloz	45	5,374	241,83	51	0,055	97,2	90,03

3. 4. Antik İnsan kemiklerinden Total Alkalen Fosfataz ve Antik Fil Kemiğinden Dış Periferik, Sitolik, İç Periferik ve İntegral Alkalen Fosfataz Enzimlerinin SDS-Poliakrilamid Jel Elektrophorez Sonuçları

Antik insan kemiklerinden Sephadex G-200 jel filtrasyon ve TEAE-selüloz iyon değişim kromatografisi kullanılarak saflaştırılan total alkalen fosfataz enziminin ve antik fil kemiğinden TEAE-selüloz iyon değişim kromatografisi kullanılarak saflaştırılan dış periferik, sitolitik, iç periferik ve integral alkalen fosfataz izoenzimlerinin saflığını kontrol etmek ve varsa alt birimlerini belirlemek amacıyla SDS-poliakrilamid jel elektrophorezi yapıldı. Bunun için 2. 5. 7.'de anlatıldığı gibi hazırlanan kesikli SDS-poliakrilamid jel elektrophorezine numuneler tatbik edildi. Belirginleşen protein bantlarının fotoğrafları çekildi (Şekil 3. 4. a. ve Şekil 3. 4. b).



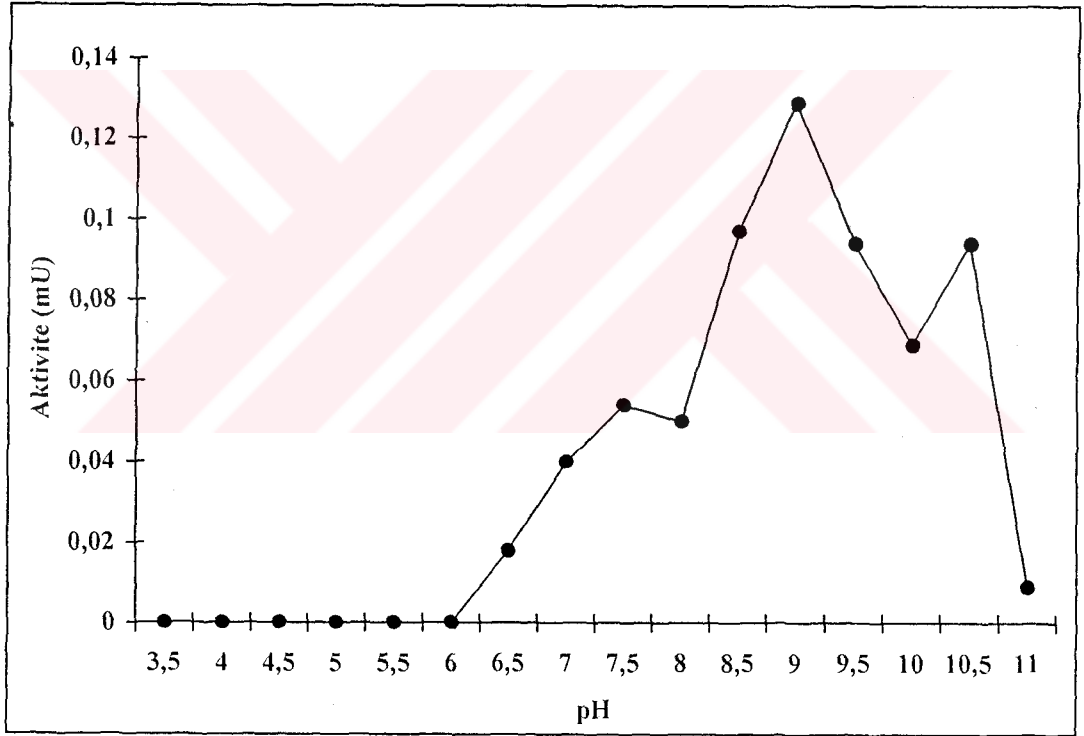
Şekil 3.4.a. Sephadex G-200 jel filtrasyon ve TEAE-selüloz iyon değişim kromatografisi ile saflaştırılan antik insan kemiklerinden total alkalin fosfataz enziminin SDS-poliakrilamid jel elektroforez fotoğrafı. 1 ve 3. sütunda kemik homojenatının, 2. sütunda ise saf enzimin oluşturduğu bantlarını görülmektedir.



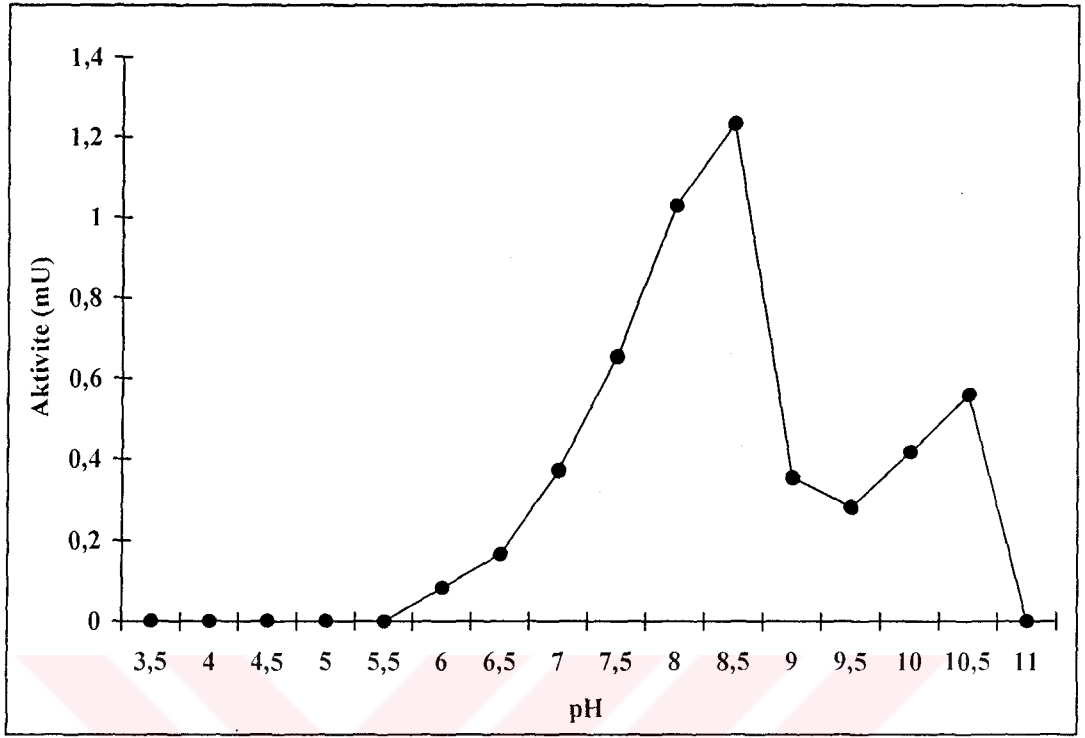
Şekil 3.2.b. TEAE-selüloz iyon değişim kromatografisi ile saflaştırılan antik fil kemiğinden dış periferel, sitozolik, iç periferel ve integral alkalen fosfataz enziminin SDS-poliakrilamid jel elektroforez fotoğrafı. 1. sütunda kemik homojenatının, 2, 3, 4 ve 5. sütunda ise sırasıyla saflaştırılan dış periferel, sitozolik, iç periferel ve integral alkalen fosfataz enziminin oluşturduğu bantlar görülmektedir.

3. 5. Antik İnsan Kemiklerinden Total Alkalen Fosfataz ve Antik Fil Kemiğinden Dış Periferal, Sitozolik, İç Periferal ve İntegral Alkalen Fosfataz Enzimlerinin Optimum pH Sonuçları

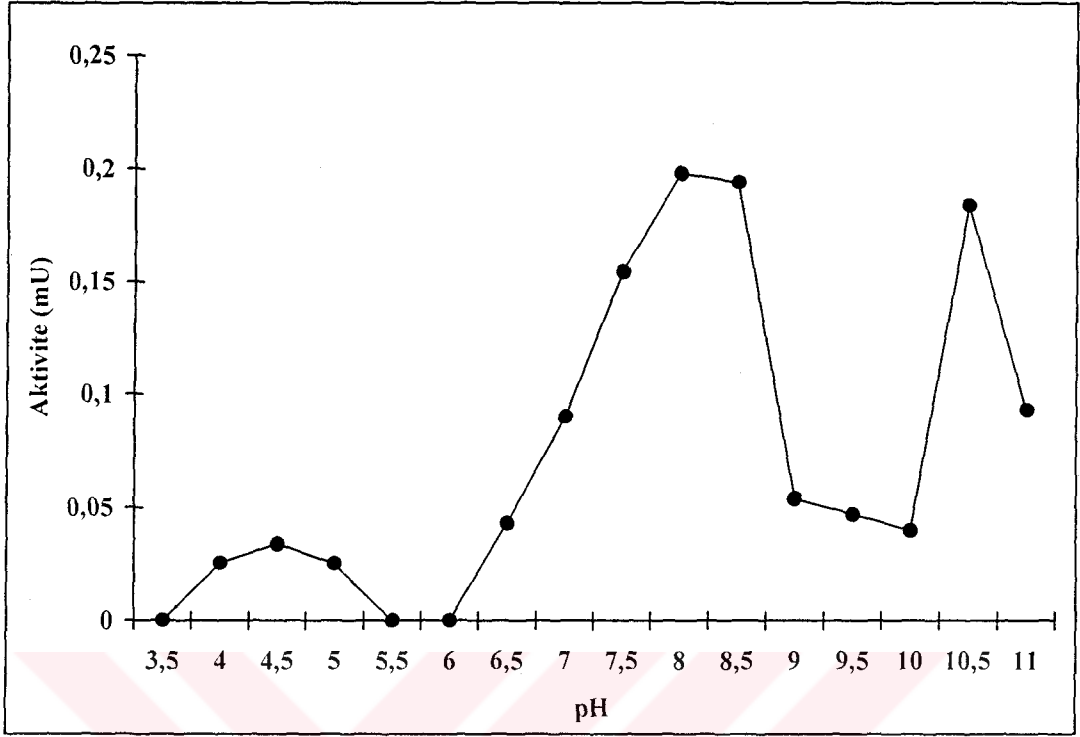
Antik insan kemiklerinden saf olarak elde edilen total alkalen fosfataz ve antik fil kemiklerinden saf olarak elde edilen dış periferal, sitozolik, iç periferal ve integral alkalen fosfataz izoenzimlerinin optimum pH'sını belirlemek için 2. 5. 8.'de anlatıldığı gibi ölçümler yapıldı. Elde edilen sonuçlarla 2. 5. 11'de anlatıldığı gibi aktivite hesaplandı ve Aktivite-pH grafikleri çizildi. Her enzim için ayrı ayrı yapılan işlemlerin sonuçları Şekil 3. 5. 1., Şekil 3. 5. 2., Şekil 3. 5. 3., Şekil 3. 5. 4. ve Şekil 3. 5. 5.'de verilmiştir.



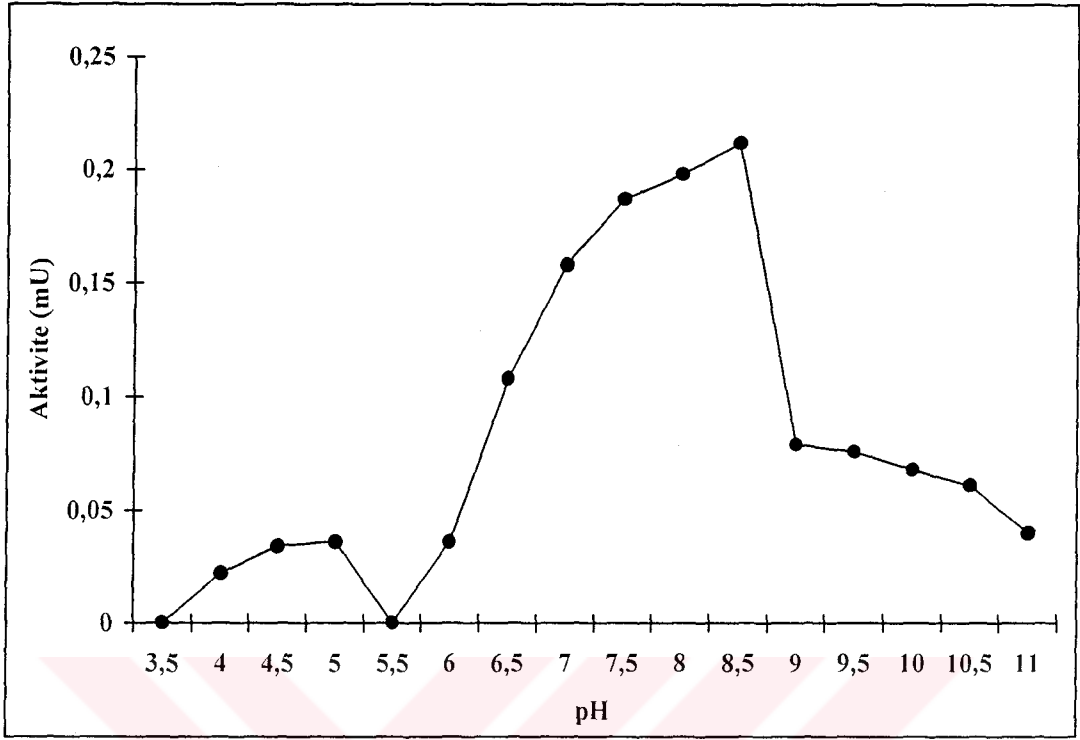
Şekil 3.5.1. Antik insan kemiklerinden izole edilen total alkalen fosfataz enziminin aktivitesi üzerine pH'nın etkisi.



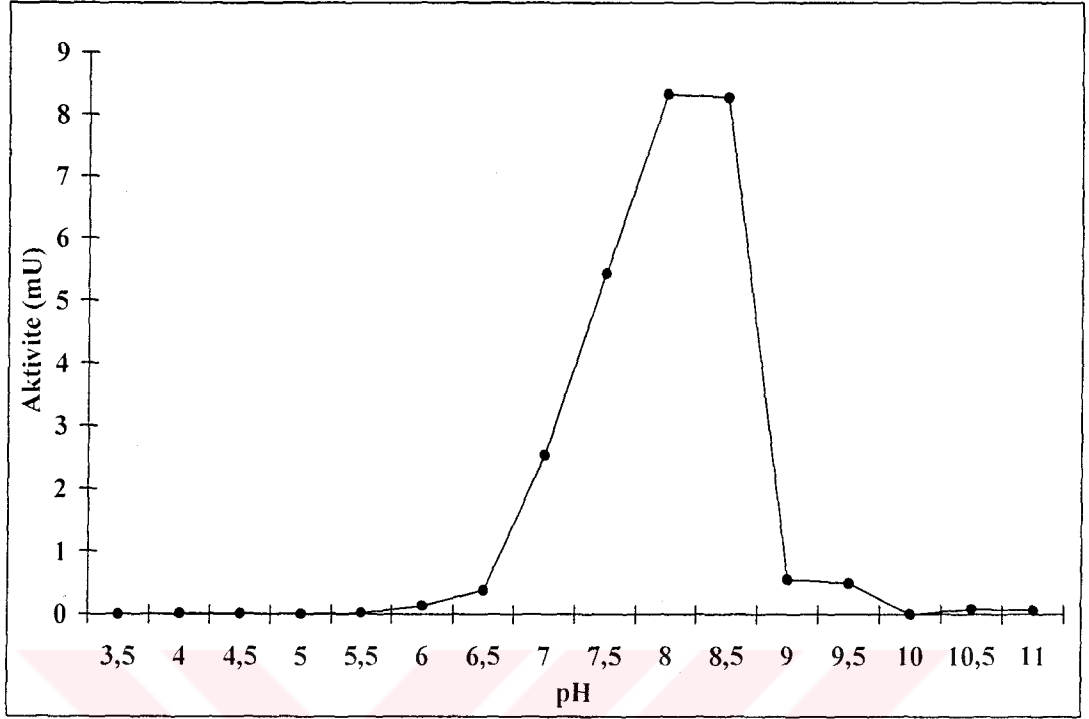
Şekil 3.5.2. Antik fil kemiğinden saflaştırılan dış periferik alkalen fosfataz enziminin aktivitesi üzerine pH'nın etkisi.



Şekil 3.5.3. Antik fil kemiğinden izole edilen sitozolik alkalen fosfataz enziminin aktivitesi üzerine pH'nın etkisi.



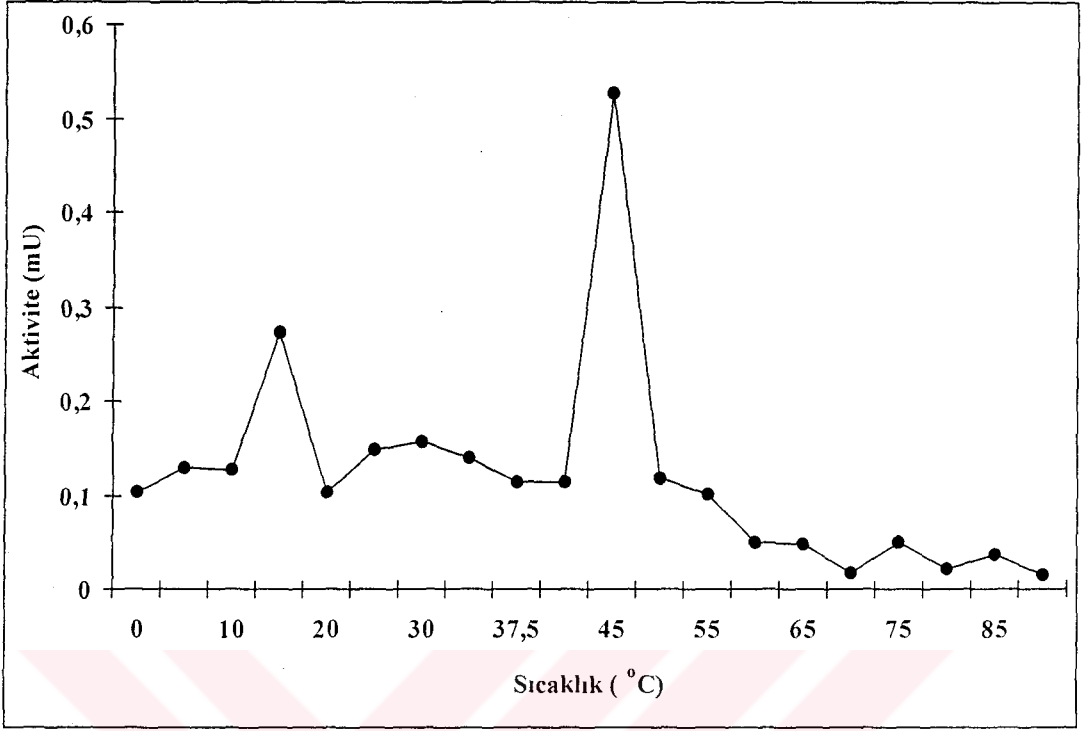
Şekil 3.5.4. Antik fil kemiğinden saflaştırılan iç periferik alkalen fosfataz enziminin aktivitesi üzerine pH'nın etkisi.



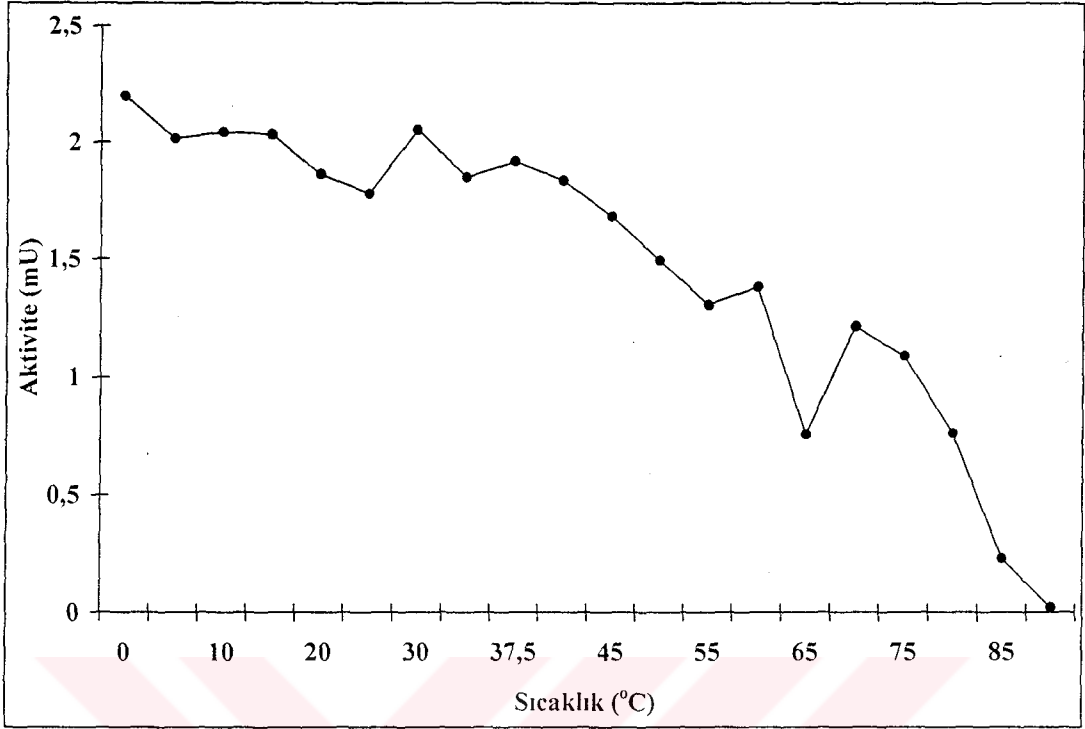
Şekil 3.5.5. Antik fil kemiğinden izole edilen integral alkalen fosfataz enziminin aktivitesi üzerine pH'nın etkisi.

3. 6. Antik İnsan Kemiklerinden Total Alkalen Fosfataz ve Antik Fil Kemiğinden Dış Periferal, Sitozolik, İç Periferal ve İntegral Alkalen Fosfataz Enzimlerinin Optimum Sıcaklık Sonuçları

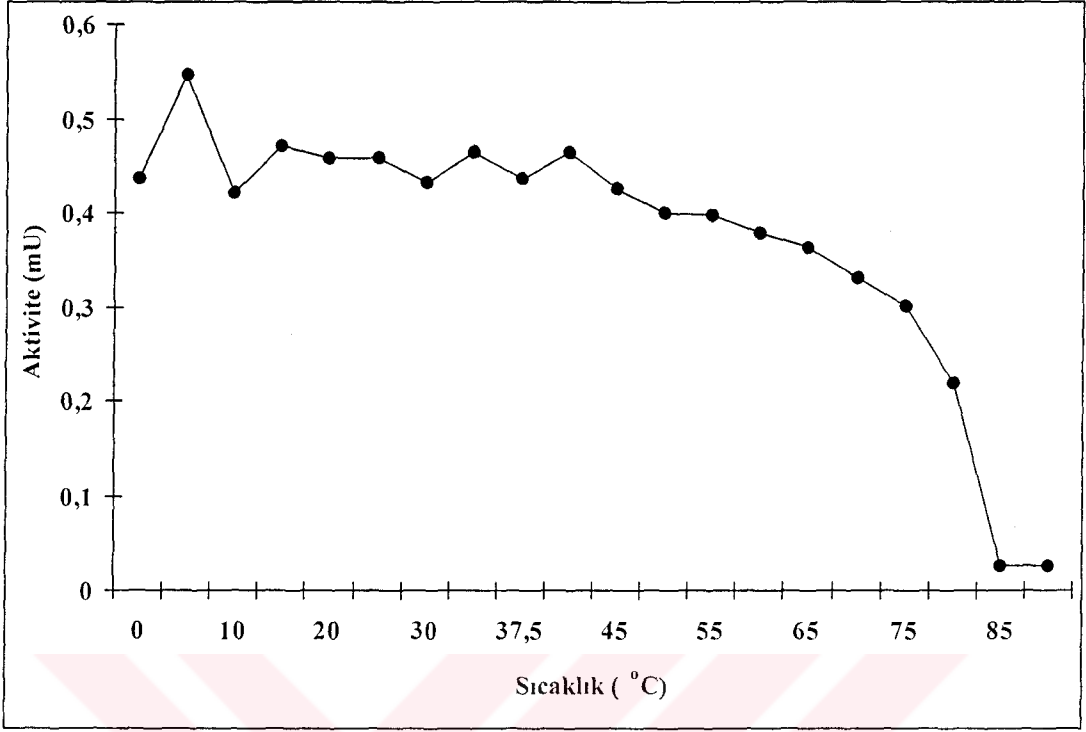
Antik insan kemiklerinden saf olarak elde edilen total alkalen fosfataz ve antik fil kemiklerinden saf olarak elde edilen dış periferal, sitozolik, iç periferal ve integral alkalen fosfataz izoenzimlerinin optimum sıcaklıklarını belirlemek için 2. 5. 9.'da anlatıldığı gibi ölçümler yapıldı. Elde edilen sonuçlarla 2. 5. 11.'de anlatıldığı gibi aktivite hesaplandı ve Aktivite-pH grafikleri çizildi. Her enzim için ayrı, ayrı yapılan işlemlerin sonuçları Şekil 3. 6. 1., Şekil 3. 6. 2., Şekil 3. 6. 3., Şekil 3. 6. 4. ve Şekil 3. 6. 5.'de verilmiştir.



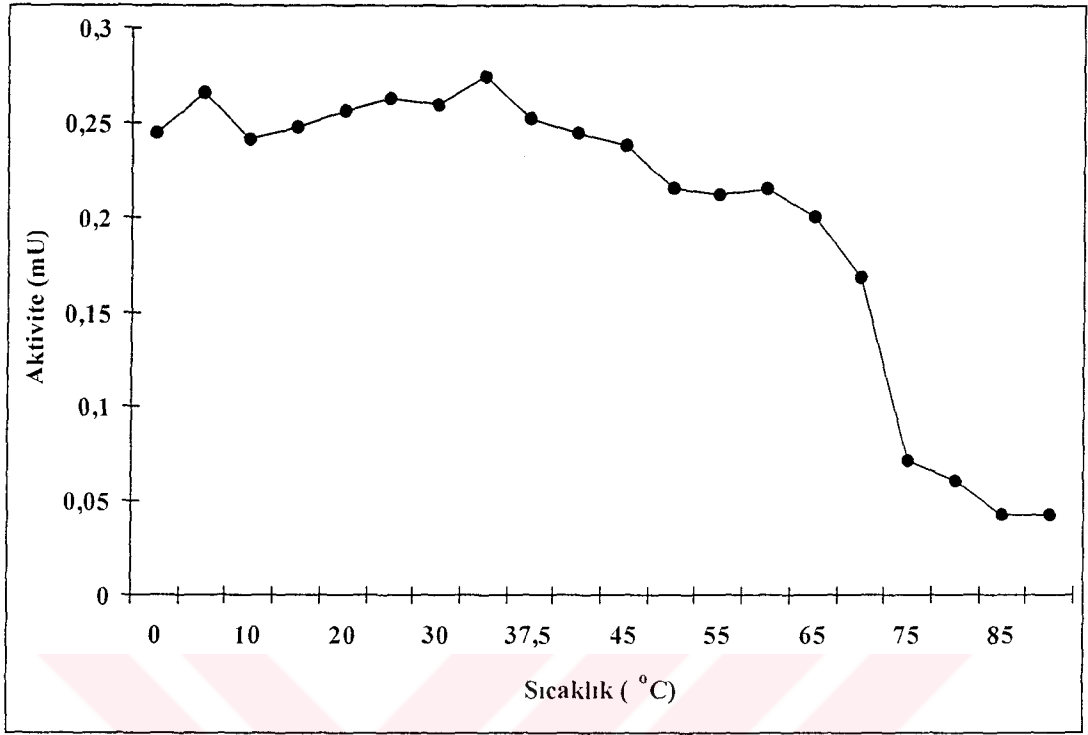
Şekil 3.6.1. Antik insan kemiklerinden saflaştırılan total alkalen fosfataz enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.



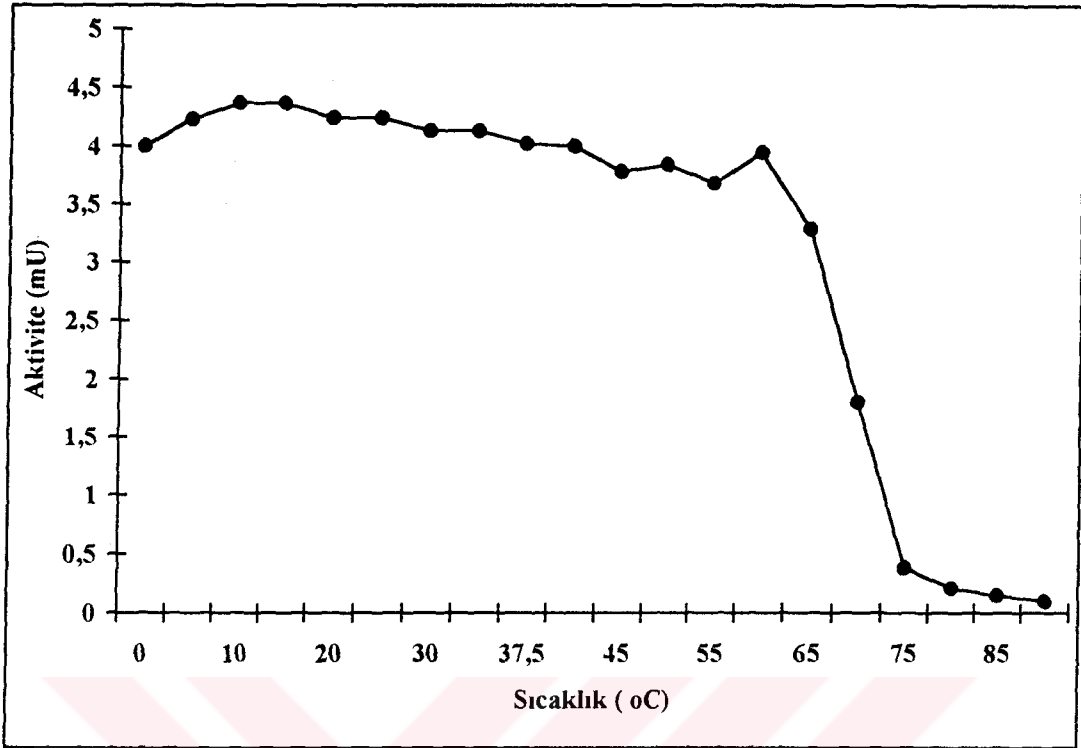
Şekil 3.6.2. Antik fil kemiğinden izole edilen dış periferel alkalen fosfataz enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.



Şekil 3.6.3. Antik fil kemiğinden saflaştırılan sitozolik alkalen fosfataz enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.



Şekil 3.6.4. Antik fil kemiğinden izole edilen iç periferik alkalen fosfataz enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.

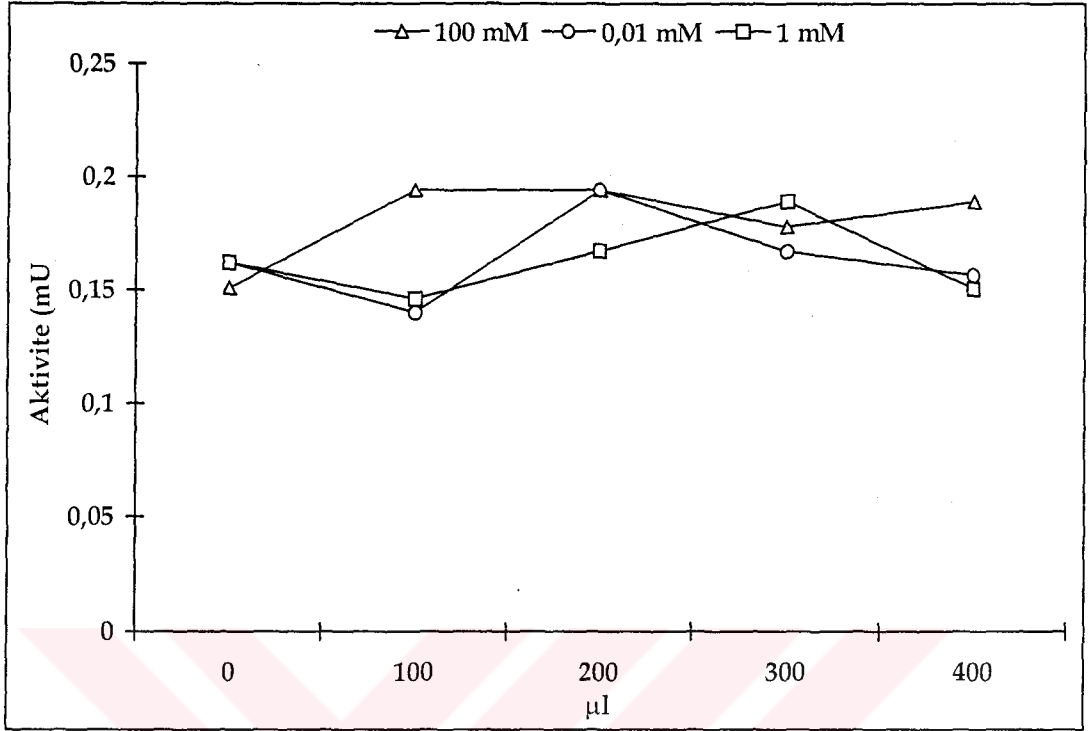


Şekil 3.6.5. Antik fil kemiğinden saflaştırılan integral alkalen fosfataz enziminin aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.

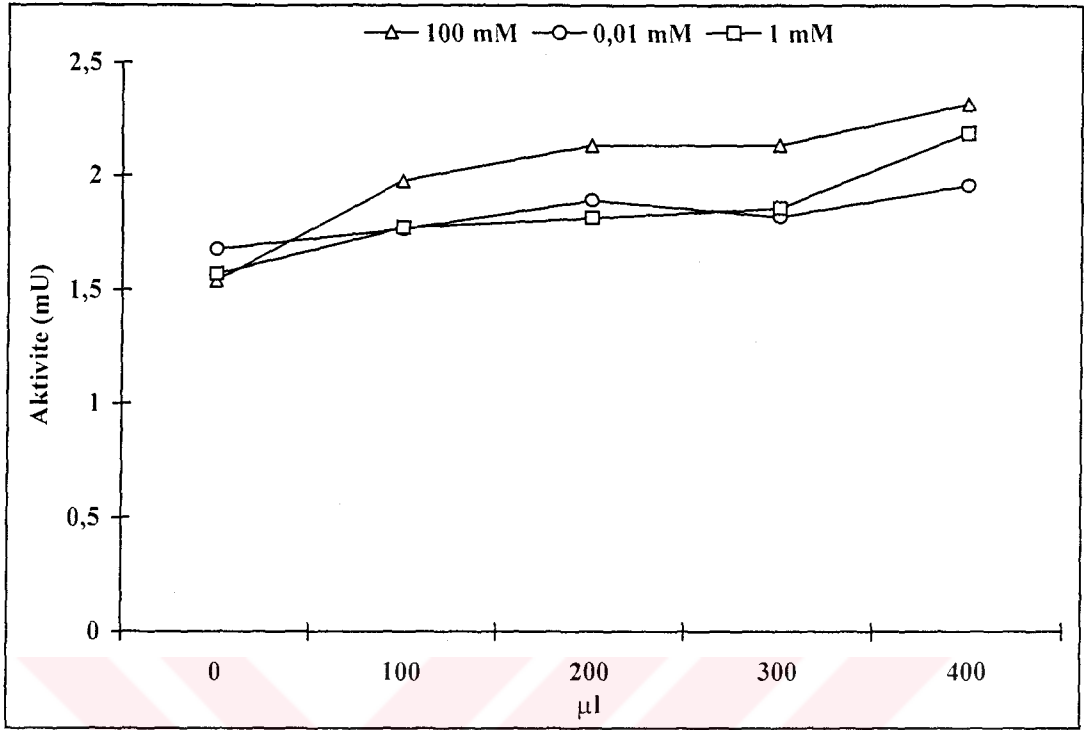
3. 7. Antik İnsan Kemiklerinden Total Alkalen Fosfataz ve Antik Fil Kemiğinden Dış Periferik, Sitozolik, İç Periferik ve İntegral Alkalen Fosfataz Enzimlerinin Aktivitesi Üzerine Ca^{+2} ve Tonocalcin Adlı İlacın Etkisi

Antik insan ve fil kemiklerinden ayrı ayrı saflaştırılan alkalen fosfataz enzimlerinin aktivitesi üzerine Ca^{+2} ve tonocalcin adlı ilacın etkisi incelenmiştir.

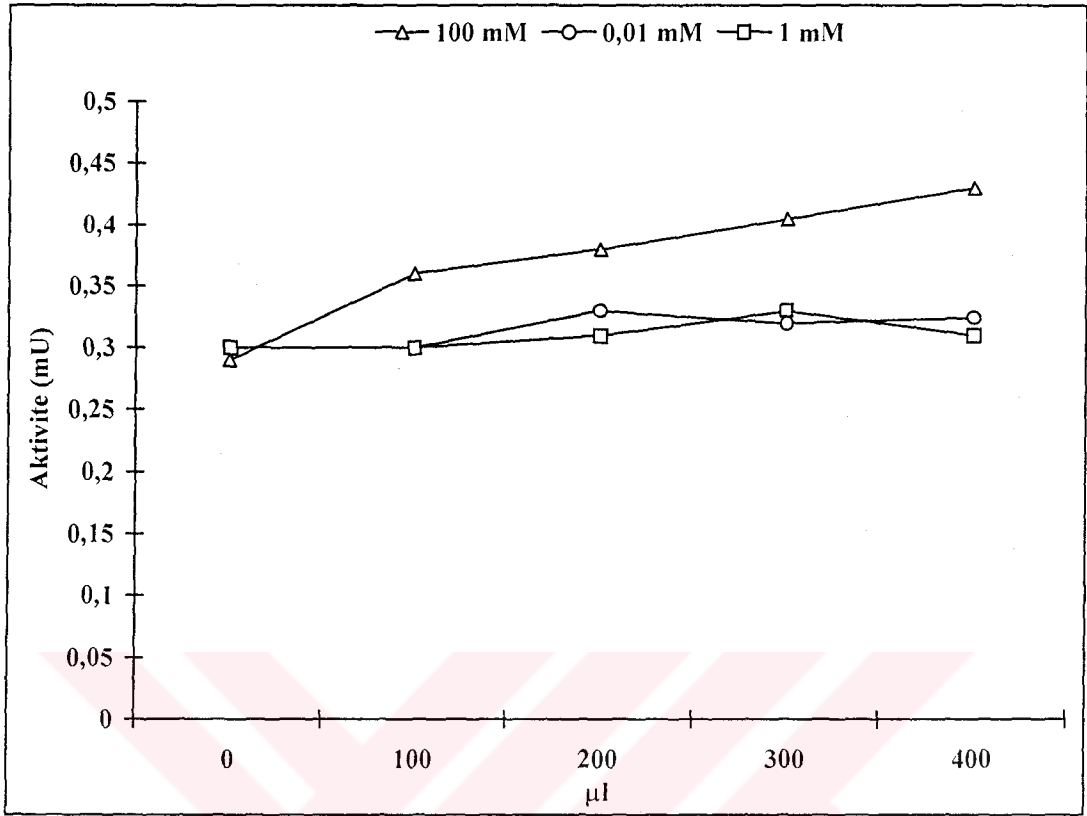
Bunun için 2. 5. 12.'de anlatıldığı gibi üç farklı konsantrasyon ve her bir konsantrasyonda dört farklı hacimde aktivite ölçümü yapıldı. Bulunan değerlere göre 2. 5. 2.'de anlatıldığı gibi aktivite birimi hesaplanarak Aktivite-µl değerlerine göre grafik çizildi. Her enzim için ayrı ayrı çizilen grafik aşağıda verilmiştir.



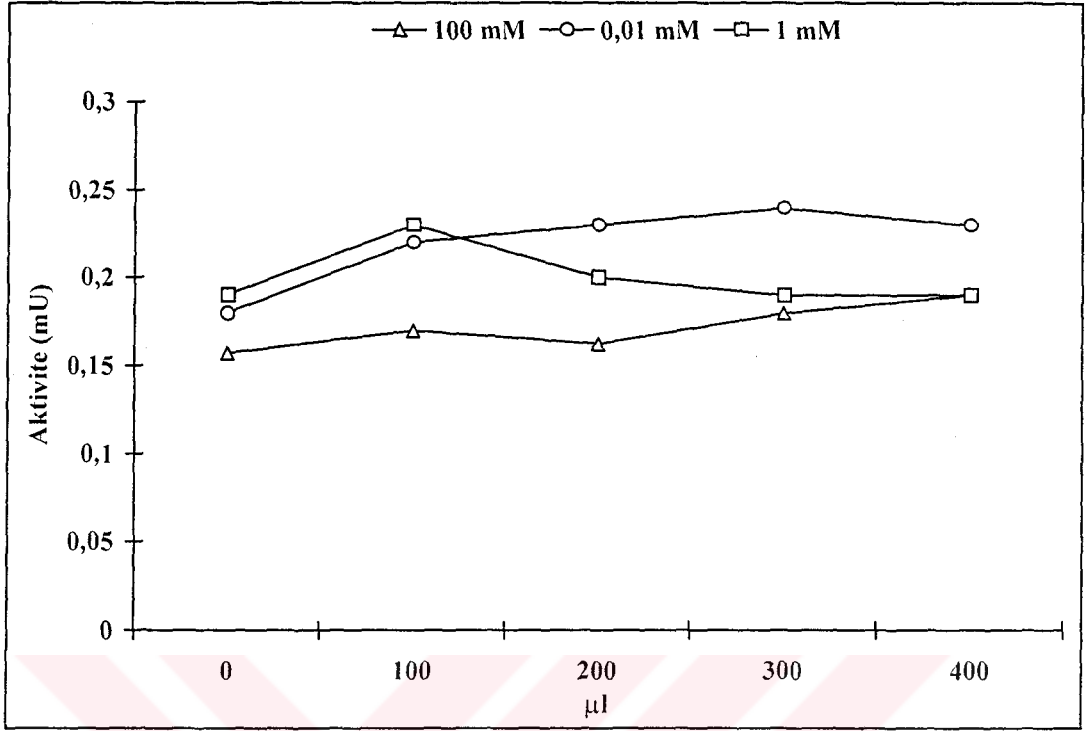
Şekil 3.7.1. Antik insan kemiklerinden saflaştırılan total alkale fosfataz enziminin aktivitesi üzerine Ca^{+2} 'nin etkisi.



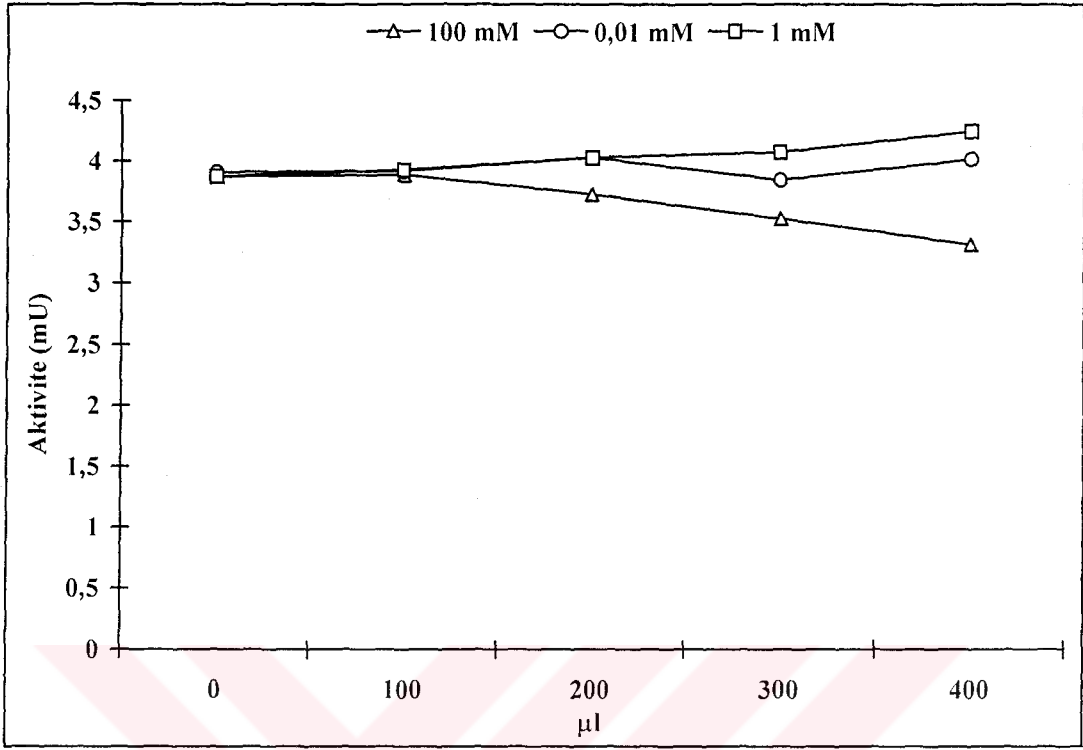
Şekil 3.7.2. Antik fil kemiğinden izole edilen dış periferik alkalen fosfataz enziminin aktivitesi üzerine Ca^{+2} 'nin etkisi.



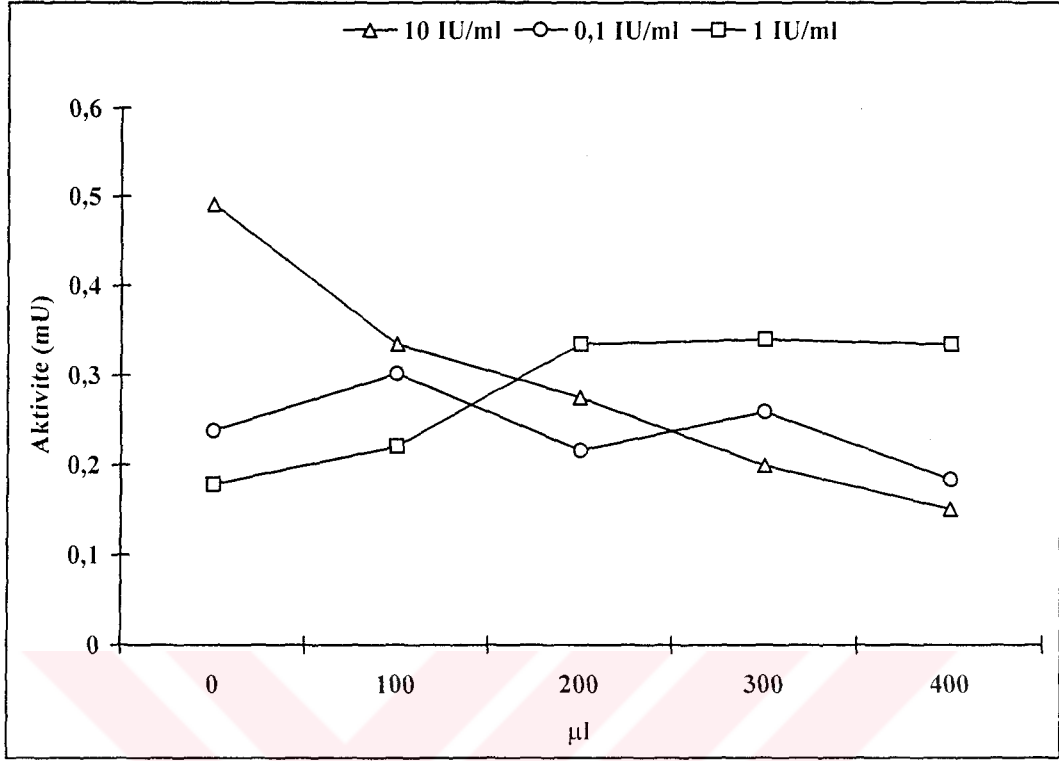
Şekil 3.7.3. Antik fil kemiklerinden saflaştırılan sitozolik alkaleen fosfataz enziminin aktivitesi üzerine Ca^{+2} 'nin etkisi.



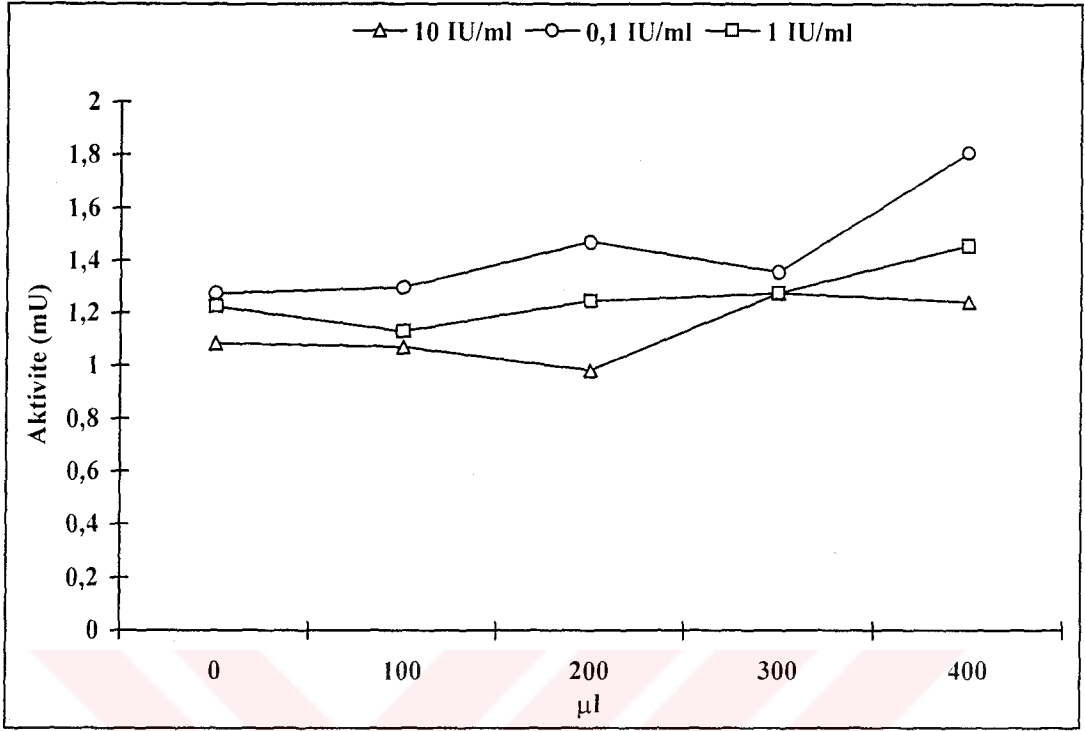
Şekil 3.7.4. Antik fil kemiğinden izole edilen iç periferik alkalen fosfataz enziminin aktivitesi üzerine Ca^{+2} 'nin etkisi.



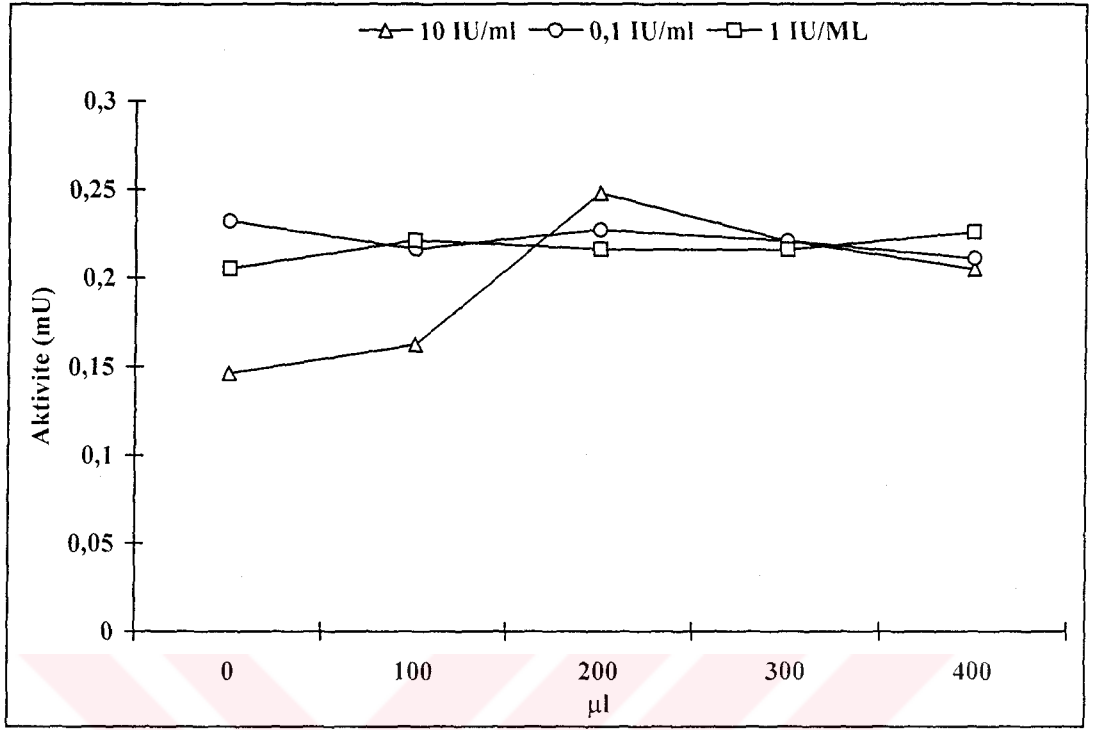
Şekil 3.7.5. Antik fil kemiğinden saflaştırılan integral alkale fosfataz enziminin aktivitesi üzerine Ca^{+2} 'nin etkisi.



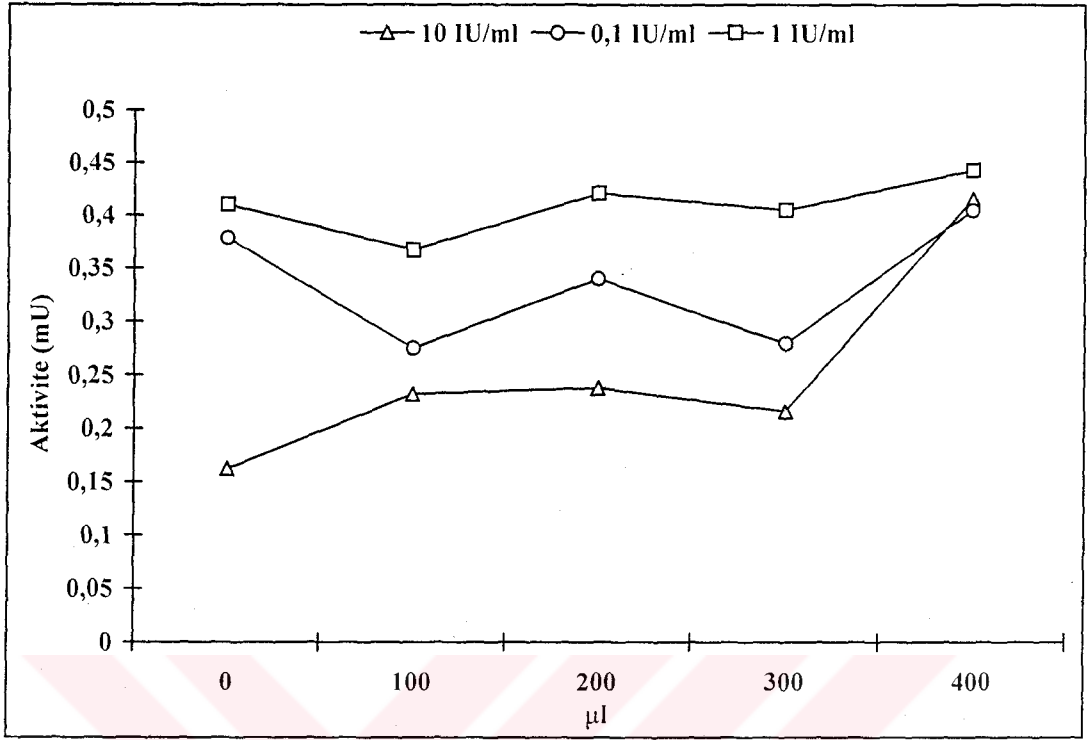
Şekil 3.7.6. Antik insan kemiklerinden izole edilen total alkalen fosfataz enziminin aktivitesi üzerine tonocalsin adlı ilacın etkisi.



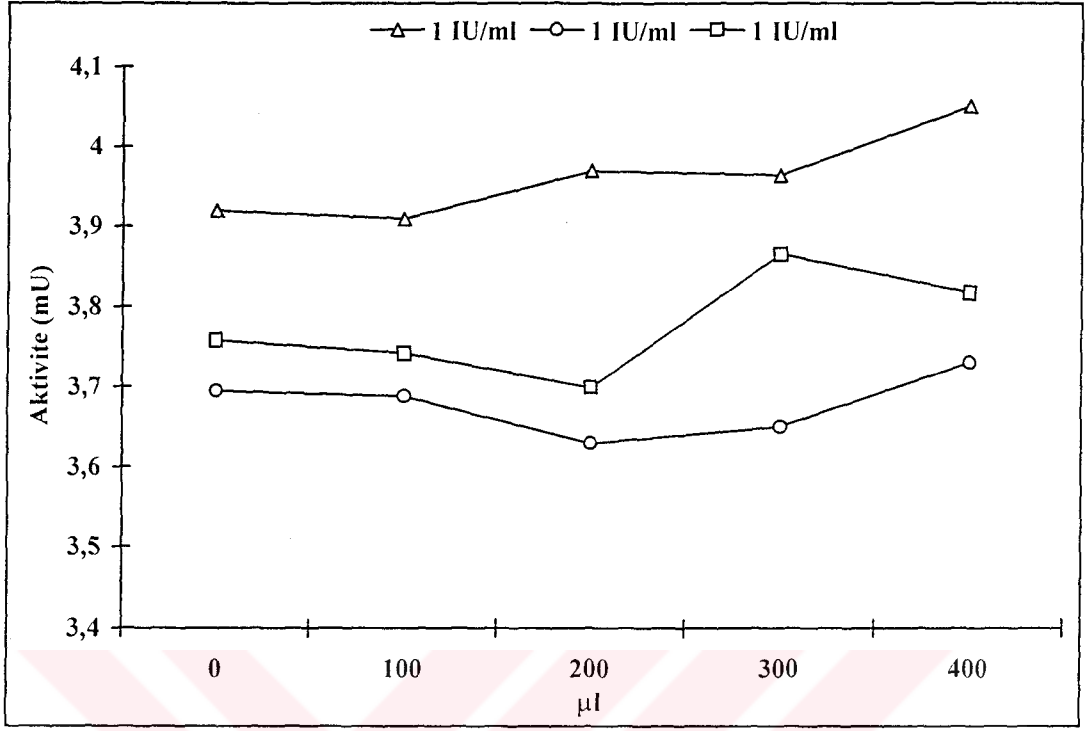
Şekil 3.7.7. Antik fil kemiğinden saflaştırılan dış periferik alkalen fosfataz enziminin aktivitesi üzerine tonocalcin adlı ilacın etkisi.



Şekil 3.7.8. Antik fil kemiğinden izole edilen sitozolik alkalen fosfataz enziminin aktivitesi üzerine tonocalsin adlı ilacın etkisi.



Şekil 3.7.9. Antik fil kemiğinden saflaştırılan iç periferik alkalen fosfataz enziminin aktivitesi üzerine tonocalcin adlı ilacın etkisi.



Şekil 3.7.10. Antik fil kemiğinden izole edilen integral alkalen fosfataz enziminin aktivitesi üzerine tonocalsin adlı ilacın etkisi.

3. 8. $V_{\max}$ ve K_M Değerlerinin Sonuçları

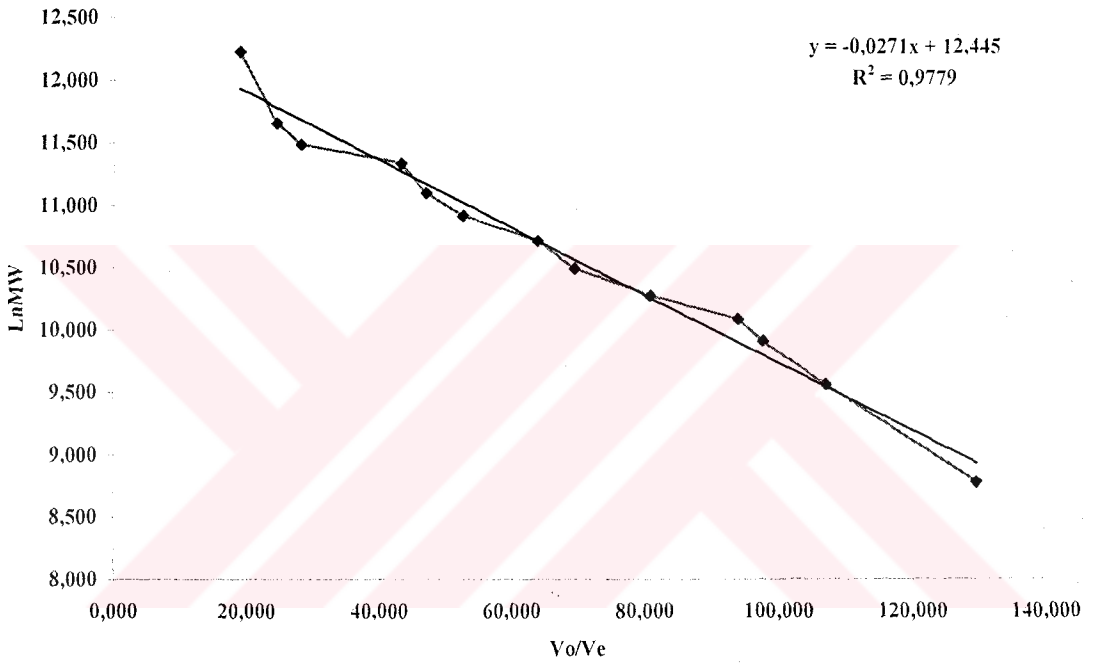
2. 5. 11.'de anlatıldığı gibi her enzim için ayrı ayrı ölçümler yapıldı. Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek $V_{\max}$ ve K_M değerleri hesaplandı. Sonuçlar Tablo 3. 9.'da verildi.

Tablo 3. 9. Antik insan kemiklerinden saflaştırılan total alkalen fosfataz ve antik fil kemiğinden ayrı ayrı saflaştırılan dış periferel, sitozolik, iç periferel ve integral alkalen fosfataz enzimlerinin $V_{\max}$ ve K_M sonuçları.

Enzimler	$V_{\max}$ ($\mu\text{mol/L. dak}$)	K_M (mM)
İnsan kemiklerinden total AP enzimi	$6,29 \times 10^{-4}$	940
Fil kemiklerinden Dış Periferel AP enzimi	$1,97 \times 10^{-3}$	113,5
Fil kemiklerinden sitozolik AP enzimi	$5,05 \times 10^{-4}$	211
Fil kemiklerinden İç periferel AP enzimi	$5,5 \times 10^{-4}$	149
Fil kemiklerinden integral AP enzimi	$7,8 \times 10^{-3}$	633

3. 9. Jel Filtrasyon Kromatografisi Sonuçları

2. 5. 10.'da anlatıldığı gibi her enzim için ayrı ayrı jel filtrasyon kromatografisi işlemi yapıldı. Bulunan değerler grafik edilerek, antik insan ve fil kemiklerinden saflaştırılan bütün enzimlerin molekül ağırlığı belirlendi. Sonuçlar Şekil 3. 9. a.'da ve Şekil 3. 9. b.'de verildi.



Şekil 3. 9. Antik insan ve kuzeydoğu anadolu step filinin (eleph:as trogontherii-mamut) kemiklerinden saflaştırılan alkalen fosfataz enzimlerinin molekül ağırlıklarının belirlenmesinde kullanılan standart Jel Filtrasyon eğrisi. Sephadex G-150, 0, 05 M Na₃PO₄, 1 mM ditiyoeritritol, pH: 7.0, (Ve: Elüsyon hacmi, Vo: Kolonun boşluk hacmi)

Standart protein	MA (Dalton)
Miyosin.....	205000
Fosforilaz B	97400
Sığır serum albumin.....	66000
Ovalbumin	45000
Karbonik anhidraz	29000
Tripsin inhibitör.....	20100
Aprotinin.....	6500

Standart protein	MA (Dalton)
β-Galaktozidaz.....	116000
Fruktoz-6-fosfat kinaz.....	84000
Glutamik dehidrogenaz.....	55000
Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz	36000
Tripsinojen.....	24000
α-Laktalbumin	14200

TARTIŞMA

Yapılan bu çalışmada önce antik insan kemiklerinden total olarak alkalen fosfataz enzimi saflaştırıldı. Antik insan kemiklerinde aktif alkalen fosfataz enziminin var olduğu belirlendi ve karakterize edildi. İnsan kemiklerinden çok daha yaşlı olan antik fil kemiklerinden alkalen fosfataz enzimi membran yüzeyine bağlı (periferal), sitoplazmada çözünmüş (sitozolik) ve membrana gömülü (integral) olmak üzere ayrı ayrı saflaştırıldı. İzoenzimlerin hepsinin aktif olduğu tespit edilip ayrı ayrı karakterize edildi. Çalışma sonuçları tartışılmadan önce kullanılan yöntemlerin seçiliş sebepleri şöyle izah edilebilir:

Alkalen fosfataz izoenzimlerinin jel filtrasyon ve iyon değişim kromatografisi ile saflaştırılması sırasında elüatlardaki protein miktarı 280 nm'de absorbansları ölçülerek belirlendi. Bu şekilde yapılan kantitatif tayin, proteinlerin yapısında bulunan tirozin ve triptofan amino asitlerinin söz konusu dalga boyunda absorbans vermesine dayanmaktadır¹⁰⁷. Saflaştırılan enzim çözeltileri mg seviyesinde elde edildiğinden, bu çözeltilerdeki protein miktarları coomassie-blue yöntemiyle belirlendi. Bu yöntemin hassasiyeti (1-200 µg) daha iyi olup daha az reaktif gerektirmektedir. Aynı zamanda her defasında standart çalışma gerektirmeyen bir yöntemdir.

Aktivite tayininin esası; alkalen fosfatazın fosfat monoesterlerinin hidrolizine dayanmaktadır. Substrat olarak seçilen bileşik, enzim katalizörlüğünde hidroliz olduktan sonra belirli bir dalga boyunda absorbans veren p-nitrofenilfosfat esteridir. Başka substratlarla da aktivite tayini yapılmakla beraber en çok kullanılan p-nitrofenilfosfattır^{35, 113}. Kullanılan bu yöntem diğer yöntemlere göre daha pratiktir. Ayrıca aktivite tayini için ticari olarak hazırlanmış p-NPP ve Tris tabletleri satılmaktadır.

Araştırma süresince spesifik aktivite, optimum pH, optimum sıcaklık, V_{max} ve K_M tayininde ve inhibitörlerin etkisinin incelenmesinde bu yöntem kullanılmıştır.

İnsan ve fil kemiğinden alkalen fosfataz enzimi önce molekül büyüklüğü esasına dayanarak saflaştırıldı. Bunun için Sephadex G-200 jel filtrasyon kromatografisi kullanıldı.

Kemik alkale fosfatazının saflaştırılması ile ilgili bütün literatürlerde Sephadex G-200 jeli kullanılmıştır. Saflaştırmanın ikinci basamağında iyon değişim kromatografisi uygulandı. Anyon değiştirici olarak trietilaminoetil kullanıldı. Böylece negatif yüklü proteinler kolonda tutularak yüklere göre ayırım yapıldı. Destek materyali olarak iyi akış özelliğine sahip selüloz seçildi. SDS-poliakrilamid jel elektroforezi ile oldukça saf bir şekilde elde edildiği anlaşıldı.

V_{max} ve K_M değerlerinin bulunmasında Linweaver-Burk grafikleri kullanıldı. Bu yöntem hemen hemen bütün çalışmacılar tarafından kullanılmaktadır².

Saf olarak elde edilen enzimlerin molekül ağırlıklarının tayin edilmesinde ise jel filtrasyon kromatografisinden yararlanıldı.

Jel filtrasyon ve iyon değişim kromatografisinden yardımıyla antik insan kemiklerinden saflaştırılan total alkale fosfataz enziminin aktivite-absorbans grafiği sırasıyla Şekil 2. 3. a., Şekil 3. 2. b.'de verilmiştir. I. saflaştırma basamağı jel filtrasyon ve II. saflaştırma basamağı iyon değişim kromatografisi ile fil kemiklerinden saflaştırılan dış periferik, sitozolik, iç periferik ve integral alkale fosfataz izoenzimlerinin aktivite-absorbans grafikleri sırasıyla Şekil 3. 3. a., Şekil 3. 3. b., Şekil 3. 3. c. Şekil 3. 3. d., Şekil 3. 3. e., Şekil 3. 3. f., Şekil 3. 3. g. ve Şekil 3. 3. h.'de verilmiştir. Ayrıca saf enzim ve homojenatlar için spesifik aktiviteler hesaplanarak saflaştırma tabloları çıkarılmıştır. Tablolara bakıldığında total AP enziminin 92,34 kat (Tablo 3.1), antik fil kemiklerinden dış periferik AP enziminin 81,1 kat (Tablo 3.2), sitozolik AP enziminin 76,5 kat (Tablo 3.3), iç periferik AP enziminin 68,04 kat (Tablo 3.4) ve integral AP enziminin 89,8 kat (Tablo 3.5) saflaştırıldığı görülmektedir.

Saf olarak elde edilen antik insan ve fil kemiklerinden AP enziminin optimum pH değerleri ve aktif oldukları pH aralıkları belirlenmiştir. Şekil 3. 5. 1.'de görüldüğü gibi antik insan kemiklerinden saflaştırılan total alkale fosfataz enziminin optimum pH'sı 9 ve aktif olduğu pH aralığı ise 6-10,5 aralığıdır. Antik fil kemiklerinden dış periferik, sitozolik, iç periferik ve integral AP izoenzimlerinin (Şekil 3. 5. 2., Şekil 3. 5. 3., Şekil 3. 5. 4., Şekil 3. 5. 5) optimum pH'ları 8,5 olarak bulunmuştur. Aktif oldukları pH ara-

lıkları ise dış periferel 6-10,5, sitozolik 4-5,5 ve 6,5-11, iç periferel 4-5 ve 6-11 ve integral 4-11 olarak bulunmuştur.

Antik insan kemiklerinden saflaştırılan total AP enziminin Şekil 3. 6. 1.'de görüldüğü gibi optimum sıcaklığı 45 °C'dir. Enzimin 0 °C'den 90 °C'ye kadar aktiftir. Antik fil kemiklerinden dış periferel AP enziminin (Şekil 3. 6. 2) maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık 0 °C'dir. Sitozolik AP enziminin (Şekil 3. 6. 3) maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık 5 °C'dir. İç periferel AP enziminin (Şekil 3. 6. 4) maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık 35 °C'dir. İntegral AP enziminin (Şekil 3. 6. 5) maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık 10 °C'dir. İzoenzimlerin dördüde 0 °C'den 90 °C'ye kadar aktivite gösterdiği bulunmuştur.

Antik insan kemiklerinden saflaştırılan total AP enziminin aktivitesi üzerine Ca^{+2} (Şekil 3. 7. 1) ve tonocalinin (Şekil 3. 7. 6) üç farklı konsantrasyonda etkisi incelenmiştir. Ca^{+2} 'nin 10^{-2} M konsantrasyonda enzimi aktive ederken 10^{-4} M ve 10^{-6} M çok azda olsa inhibe etmiştir. Tonocalin ise 10 IU/ml ve 0,1 IU/ml'de inhibe etmiş olup, 1 IU/ml'de aktive etmiştir. Ca^{+2} 10^{-4} M ve 10^{-6} M konsantrasyonda 100 µl'de inhibisyon yaptığı, 200 ve 300 µl'de ise enzimi aktive ettiği ve 400 µl'de enzimi tekrar inhibe ettiği görülmüştür. Tonocalinin en düşük konsantrasyonunda (0,1 IU/ml) 100 ve 300 µl'de enzimin aktive olduğu ve 200 ve 400 µl'de ise enzimin inhibe olduğu bulunmuştur.

Antik fil kemiklerinden saflaştırılan dış periferel, sitozolik, iç periferel ve integral alkalin fosfataz enzimlerinin aktivitesi üzerine Ca^{+2} iyonunun 10^{-2} M, 10^{-4} M ve 10^{-6} M olmak üzere üç farklı konsantrasyonda etkisi incelenmiştir. Ca^{+2} iyonunun her üç konsantrasyonda da sitozolik (Şekil 3. 7. 3) ve dış periferel (Şekil 3. 7. 2) AP izoenzimlerinin aktivitelerini artırdığı bulunmuştur. İç periferel (Şekil 3. 7. 4) AP enziminin 10^{-2} M ve 10^{-6} M aktive ederken 10^{-4} M çok azda olsa inhibe eder. Son olarak integral (Şekil 3. 7. 5) AP enzimini 10^{-4} M ve 10^{-6} M'de aktive etmiştir. 10^{-2} M'de ise inhibe etmiştir. İç periferel AP enziminin 10^{-4} M konsantrasyonda 100 µl'lik hacimde oldukça aktive etmiş ve hacim artıkça inhibisyon etkisi göstermiştir. İntegral AP enzi-

minin 10^{-2} M konsantrasyonda 100 μ l'lik hacimde aktiviteyi artırmış ve 200 μ l'lik hacimden sonra hacim artarken inhibisyon etkisini artırmıştır.

10 IU/ml, 1 IU/ml ve 0,1 IU/ml'lik konsantrasyonlarda tonocalsinin antik fil kemiklerinden AP izoenzimlerinin aktiviteleri üzerine etkisi incelenmiştir. Tonocalsin her üç konsantrasyonda da dış periferal (Şekil 3. 7. 7), sitozolik (Şekil 3. 7. 8), iç periferal (Şekil 3. 7. 9) ve integral (Şekil 3. 7. 10) AP izoenzimlerinin aktivitelerini artırmıştır. Sitozolik AP enziminin ise 10 IU/ml ve 1 IU/ml konsantrasyonda aktive ederken 0,1 IU/ml'de inhibe etmiştir. Dış periferal AP enzimi 10 IU/ml ve 1 IU/ml önce inhibe olmuşlar ve hacim arttıkça bu etki kaybolmuştur. İç periferal ve integral AP enzimi ise her üç konsantrasyonda önce azda olsa inhibe olmuşlar sonra hacim arttıkça aktivitelerini kazanmışlar.

Antik insan kemiklerinden saflaştırılan total AP enziminin V_{max} ve K_M değerleri sırasıyla $6,29 \times 10^{-4}$ μ mol/l. dak., 940 mM olarak bulunmuştur.

Antik fil kemiklerinden saflaştırılan dış periferal, sitozolik, iç periferal ve integral alkalin fosfataz enzimlerinin V_{max} değerleri sırasıyla $1,97 \times 10^{-3}$ μ mol/l.dak., $5,48 \times 10^{-4}$ μ mol/l.dak., $2,5 \times 10^{-4}$ μ mol/l.dak. ve $7,8 \times 10^{-3}$ μ mol/l.dak. olarak bulunmuştur. K_M değerleri ise yine sırasıyla 113,5 mM, 211mM, 149 mM ve 633 mM olarak bulunmuştur.

Antik insan ve fil kemiklerinden saflaştırılan alkalin fosfataz izoenzimlerinin molekül ağırlıkları, jel filtrasyon kromatografisi kullanılarak belirlendi. Antik insan kemiklerinde molekül ağırlığı 191.980 ve 58.070 dalton olan alkalin fosfataz aktivitesine sahip iki proteine rastlanmıştır ve literatür bilgisine uygundur¹⁰⁵. Antik fil kemiklerinden saflaştırılan dış periferal, sitozolik, iç periferal ve integral alkalin fosfataz izoenzimlerinin molekül ağırlıkları ise 160.000 dalton oldukları bulunmuştur.

Bu sonuçlar göz önüne alındığında, insan ve fil kemiklerinden saflaştırılan alkalin fosfataz enzimleri için;

1. Antik insan kemiklerinden saflaştırılan alkalen fosfataz enziminin optimum sıcaklığı 35 °C,
2. Optimum pH'sı 9,
3. V_{max} değeri $6,29 \times 10^{-4} \mu\text{mol/l.dak.}$, K_M değeri ise 940 mM olarak bulunmuştur.
4. Ca^{+2} ve tonocalsin enzimin aktivitesini genel olarak azaltmıştır.
5. Antik insan kemiklerinde alkalen fosfataz aktivitesine sahip ve moleköl ağırlıkları 191.980 ve 58.070 dalton olan iki protein bulunmuştur.
6. Antik fil kemiklerinden saflaştırılan dış periferel, sitozolik, i periferel ve integral alkalen fosfataz enzimlerinin optimum sıcaklıkları 0 °C, 5 °C, 35 °C ve 10 °C,
7. Optimum pH'ları dış periferel, sitozolik, i periferel ve integral alkalen fosfataz enzimlerinin hepsi için 8,5,
8. V_{max} değerleri sırasıyla $1,97 \times 10^{-3} \mu\text{mol/l.dak.}$, $5,48 \times 10^{-4} \mu\text{mol/l.dak.}$, $2,5 \times 10^{-4} \mu\text{mol/l.dak.}$ ve $7,8 \times 10^{-3} \mu\text{mol/l.dak.}$ iken K_M değerleri ise yine sırasıyla 113,5 mM, 211 mM, 149 mM ve 633 mM olarak bulunmuştur.
9. Ca^{+2} ve tonocalsin izoenzimlerin aktivitesini genel olarak artırmıştır.
10. Antik fil kemiklerinden saflaştırılan dış periferel, sitozolik, i periferel ve integral alkalen fosfataz izoenzimlerinin moleköl ağırlıkları 160.000 dalton olarak bulunmuştur.

KAYNAKLAR

1. Onat, T. , Emerk, K. 1997, Temel Biyokimya, Saray Medikal Yayıncılık, (2. Baskı), İzmir.
2. Karlson, P. , Telefoncu, A. , 1998, Tıp ve Fen Bilimciler İçin Biyokimya, Sermet Mat. , Kırıkkale, s. 68.
3. Lehninger, A. 1. , 1982, Principles Of Biochemistry, Worth Publishers, INC. , New York, s. 207.
4. Tekman, S. ve Ömer, N. , 1981, Genel Biyokimya, Fatih Yayınevi Matbaası (3. Baskı) İstanbul, 9, s. 335.
5. Keha, E. E. ve Küfrevioğlu, İ. Ö. , 1997, Biyokimya, Şafak Yayınları, (2. Baskı) Erzurum, s. 89.
6. Bingöl, G. , 1983, Biyokimya, Güven Matbaası, Ankara, s. 285.
7. Stryer, L. , 1981, Biyochemistry, W. M. , Freeman And Company, San Fransisco, p. 103.
8. Coleman, J. E. ve Gettins, P. , 1983, Advances in Enzymol. , 55, 381-452.
9. Magnusson, P. , Larson, L. , Magnusson, M. , Davie, M. W. J. ve Sharp, A. S. , 1999, J. Bone Miner. Res. , 14, 1926-33.
10. Suzuki, U. , Yoshimura, Y. ve Takaishi, M. , 1907, Tokyo Imp. Univ. Coll. Agr. Bull. , 7, 503.
11. Grosser, P. ve Husler, J. , 1912, Biochem, Z. , 39, 1.
12. Robinson, R. , 1923, Biochem, J. , 17, 286-93.
13. Robinson, R. ve Soames, K. M. , 1924, Biochem. J. , 18, 740.
14. Levene, P. A. ve Dillon, R. T. , 1930, J. Biol. Chem. , 88, 753.
15. Graham, W. R. ve Kay, H. D. , 1933, J. Dairy Research, 5, 54.
16. Lawazack, H. , 1924, Biochem. Z. , 145, 351.
17. Martland, M. , Hansman, F. S. , ve Robinson, R. , 1924, Biochem. J. 18, 1152.
18. Davies, D. R. , 1934, Biochem, J. , 28, 529.
19. Schales, O. ve Arai, K. , 1959, ABB, 83, 152.
20. Schuchardt, W. , 1935, Biochem. Z. , 278, 164.
21. Nguyen-Van-Thoai, Roche, J. ve Roger, M. , 1945, Compt. rend. acad sci. , 139, 823.

22. Roche, J. , 1950, The Enzymes, (1. Baskı), 1, 473.
23. Nguyen-Van-Thoai ve Roche, J. , 1950, Advances in Enzymol. , 10, 83.
24. Nguyen-Van-Thoai, Roche, J. ve Sartori, L. , 1944, Compt. rend. acad. sci. , 138, 47.
25. Garen, A. ve Levinthal, C. , 1960, BBA, 38, 470.
26. Mathies, J. C. , 1958, J. Biol. Chem. , 233, 1121.
27. Meyerhof, O. ve Green, H. , 1950, J. Biol Chem. , 183, 377.
28. Harkness, D. R. , 1968, Arch. Biochem. Biophys. , 126, 503.
29. Ghosh, N. K. ve Fishman, W. H. , 1968, Biochem. J. , 108, 779.
30. Gerbitz, K. D. , Kolb, H. J. ve Wieland, O. H. , 1977 Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. , 358, 439.
31. Felix, R. ve Fleisch, H. , 1974, Biochim. Biophys. Acta. 350, 84.
32. Eaton, R. H. ve Moss, D. W. , 1968, Enzymologia, 35, 31.
33. Chappelet-Tordo, D. , Fosset, M. , Iwatsubo, M. , Gache, C. ve Lazdunski, M. , 1974, Biochem. , 13, 1788.
34. Cathala, G. , Brunel, C. , Chappelet-Turdo, D. ve Lazdunski, M. , 1975, J. Biol. Chem. , 250, 6040.
35. Ohkubo, A. , Langerman, N. ve Kaplan, M. M. , 1974, J. Biol. Chem. , 249, 7174-80.
36. Coleman, J. E. ve Chlebowski, J. F. , 1979, Adv. Inorg. Biochem. , 1, 1.
37. Bradshaw, R. A. , Cancedda, F. , Ericsson, L. H. , Neumann, P. A. , Piccoli, S. P. , Schlesinger, M. J. , Shrieffer, K. ve Walsh, K. A. , 1981, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. , 78, 3473.
38. Yoshizumi, F. K. ve Coleman, J. E. , 1974, Arch. Biochem. Biophys. 160, 255.
39. Hulett-Cowling, F. M. ve Campbell, L. L. , 1971, Biochem. , 10, 1364.
40. Glew, R. N. ve Heath E. C. , 1971, J. Biol, Chem. , 246, 1556-65.
41. Ried, T. W. ve Wilson, I. B. , 1971, Enzymes, 4, 373.
42. Chlebowski, J. F. , Armitage, I. M. ve Coleman, J. E. , 1977, J. Biol, Chem. 252, 7053.
43. Chlebowski, J. F. ve Coleman, J. E. , 1974, J. Biol. Chem. 249, 7192.
44. Mushak, P. ve Coleman, J. E. , 1972, Biochem. , 11, 201.
45. Wilson, I. B. , Dayan, J. ve Cyr, K. , 1964, J. Biol. Chem. , 239, 4182.

46. Cadeau, B. J. ve Malkin, A. , 1973, Clin. Chim. Acta, 45, 235-42.
47. Moss, D. W. ve Whitby, G. L. , 1975, Clin, Chim. Acta, 61, 63-71.
48. Pasen, S. P. , Neale, F. C. ve Clubb, J. S. , 1965, Ann. Int. Med. , 62, 1234-43.
49. Muriel, B. , Besson, F. ve Roux, B. , 1999, Proteins, 37 (2), 310-318.
50. Briere, R. O. , 1979, CRC Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. , 10, 1-30.
51. Ghosh N. K. , Fishman W. H. , 1966, J. Biol. Chem. , 241, 2516-22.
52. Fishman, W. H. , 1989, Clin. Chim. Acta, 186, 129-32.
53. Green, S. , Antis, C. L. ve Fishman W. H. , 1971, Enzymologia 41, 9-26.
54. Mulivor, R. A. Plotkin L. I. ve Harris, H. , 1978, Ann. Hum. Genet. , 42, 1-13.
55. Fishman, W. H. Green, S. ve Inglis, N. I, 1963, Nature, 198, 685-6.
56. Lin. C-W, Sie, H-G ve Fishman, W. H. , 1971, Biochem, J. , 124, 509-16.
57. Lin. C-W ve Fishman, W. H. , 1972, J. Biol. Chem. , 247, 3082-7.
58. Doellgast, G. J. ve Fishman, W. H. , 1976, Nature, 259, 49-51.
59. Millan J. L. ve Manes, T. , 1988, Proc. Natl. Acad Sci. USA, 85, 3024-8.
60. Millan, J. L. , 1986, J. Biol. Chem. , 261, 3112-5.
61. Millan, J. L. ve Fishman, W. H. , 1995, Cri. Rev. Clin. Lab. Sci. , 32, 1-39.
62. Hummer, C. ve Millan J. L. , 1991, Biochem. J. , 274, 95-1.
63. Hoylaerts M. F. ve Millan, J. L. , 1991, Eur. J. Biochem. , 202, 605-16.
64. Hoylaerts M. F. , Manes, T. ve Millan, J. L. , 1992, Biochem. J. 286, 23-30.
65. Chou, P. Y. ve Fasman, G. A. , 1978, Advances In Enzymol. , 47, 45.
66. Reynolds, J. A. ve Schlesinger, M. J. , 1967, Biochem. , 6, 3552.
67. Bosron, W. F. , Anderson, R. A. , Falk, M. C, Kennedy, F. S. ve Vallee, B. L. ,
1977, Biochem. , 16, 610.
68. Kam W. , Clauser, E. ve Kim, Y. S. , 1985, Proc. Natl. Acad Sci. USA, 82, 8715-9.
69. Henthorn, P. S. , Knoll, B. J. ve Raducha, M. , 1986, Proc. Natl. Acad Sci. USA,
83, 5597-601.
70. Weiss, M. J. , Henthorn, P. S. ve Lafferty, M. A. , 1983, Proc. Natl. Acad Sci. U-
SA, 83, 7182-6.
71. Henthorn, P. S. , Raducha, M. ve Edwards, Y. H. , 1987, Proc. Natl Acad Sci. U-
SA, 84, 1234-8.
72. Berger, J. ve Grattini, E. , 1987, Proc. Natl. Acad Sci. USA, 84, 7182-6.

73. Harris, H. , 1990, Clin. Chim. Acta, 186, 133-150.
74. Millan, J. L. , 1988, Anticancer Res. , 8, 995-1004.
75. Low, M. G. , 1988, Science, 239, 268-75.
76. Takami, N. , Ogata, S. ve Oda, K. , 1988, J. Biol. Chem. , 263, 3016-21.
77. Sowadski, J. M. , Handschumacher, M. D. ve Murthy, H. M. K. , 1985, J. Mol. Biol. , 186, 417-33.
78. Watanabe, T. , Wada, N. ve Chou, J. Y. , 1992, Biochem. , 31, 3051-8.
79. Micanovic, R. , Bailey, C. A. Ve Brink, L. , 1988, Proc. Natl. Acac Sci. USA, 85, 1398-402.
80. Micanovic, R. , Gerber, L. D. ve Berger, J. , 1990, Proc. Natl. Acad Sci. USA, 87, 157-61.
81. Low, M. G. ve Finean, J. B. , 1977, Biochem. J. , 167, 281-4.
82. Hugon, J. ve Borgers, M. , 1966, J. Histochem. , Cytochem. , 14, 629-35.
83. Fishman. L. , Miyayama, H. ve Driscoll, S. G. , 1976, Cancer. Res. , 36, 2268-73.
84. Hustin, J. , Collette, J. ve Franchimont, P. , 1987, Int. J. Androl. , 10, 29-35.
85. Goldstein, D. J. , Rogers, C. ve Harris, H. , 1982, Clin. Chim. Acta. , 125, 63-75.
86. Magnusson, P. , Degerblad, M. , Saaf, M. , Larsson, L. ve Thoren M. , 1997, J. Bone Miner. Res. , 12, 210-20.
87. Calvo, M. S. , Eyre, D. R. ve Gundberg, C. M. , 1996, Endocr. Rev. , 17, 333-68.
88. Mc. Comb. , R. B. Bowers, G. N. ve Posen, S. , 1979, Alkaline PH:ospH:atase, New York, Plenum.
89. Langlois, M. R. , Delanghe, J. R. , Kaufman, J. M. , De Buyzere, M. L. , Van Hoecke, M. J, ve Leroux-Roels G. G. , 1994, Eur, J. Clin. Chem. Clin. Biochem, 32, 675-80.
90. Van Hoof, V. O. ve De Broe, M. E. , 1994, Crit. Rev. Clin. Lab. Sci. , 31, 197-293.
91. Magnusson, P. , Löfman, O. Ve Larsson, L. , 1992, J. Chromatogr. , 576, 79-86.
92. Magnusson, P. , Löfman, O. ve Larsson, L. , 1993, Anal. Biochem. , 211, 156-63.
93. Magnusson, P. , Hager, A. ve Larsson, L. , 1995, Pediatr. Res. , 38, 955-61.
94. Magnusson, P. , Larsson, L. , Englund, G. , Larsson, B. , Strang, P. ve Selin-Sjögren, L. , 1998, Clin. Chem. , 44, 1621-8.

95. Chapman, J. F. , Woodart, L. L. ve Silverman, L. M. , 1989, Clinical Chemistry: Theory, Analysis, And Correlation, 2. Baskı, p 902-6.
96. Moss, D. W. , 1992, Clin. Chem. , 38, 2486-92.
97. Moss, D. E. ve Edwards, R. K. , 1984, Clin, Chim. Acta, 143, 177-82.
98. Rosalki, S. B. ve Ying Fao, A. , 1984, Clin. Chem. 30, 1182-6.
99. Hough, S. F. , 1987, South Afr. Med. J. , 72, 116-9.
100. Rico, H. , Hernandez, R. E. , Cabrane, A. J. ve Gomez-Gastresana, F. , 1989, Calcif. Tissue Int. , 45, 71-3.
101. Weiss, R. E. ve Reddi, A. H. , 1980, Am. J. Physiol. , 238, E200-E207.
102. Rao, M. M. G. ve Morghom, O. L. , 1986, Enzyme, 35, 57-9.
103. Ali, S. Y. , Sajdera, S. W. ve Anderson, H. C. , 1970, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 67, 1531-20.
104. Whyte, M. , 1989, The Metabolic Basis Of Inherited Disease. 6. Baskı, 2, 2846-56.
105. Weser, U. , Etspüler, H. ve Kaup, Y. , 1995, FEBS Let. , 375, 280-2.
106. Bsky, A. L. , Posner, a. S. , 1984, Bone Structure, Composition and Mineralizasyon. Symposium on Metabolik Bone Disease. 5, 597-613.
107. Mc Intosh, J. E. A. , 1969, Biochem. J. , 114, 463.
108. Bradford, M. M. , 1976, Annal. Biochem, 72, 248.
109. Dayan E. , 1990, Doğa-Tr. J. Of. Zoology, 14, 353-60.
110. Arslan, O. , Naltbantoğlu, B. , Demir, N. , Özdemir, H. ve Küfrevioğlu, İ. Ö. , 1996, Türk J. Med Sci. 26, 163.
111. Laemmli, D. K. , 1970, Nature (London), 227, 680.
112. Kendall, A. G. ve Tashian, R. E. , 1977, Science, 197, 411.
113. Kaup, Y. , Baumer, U. , Koller, J. , Hedges, R. E. M. , Werner, H. , Hartmann, H-J. , Etspüler, H. ve Ulrich, W. , 1994, Z. Naturforsch, 49, 489-500.

T.C. YÜKSEK ÖĞRETİM BAKANLIĞI
YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
12.05.2014