

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
FEN FAKÜLTESİ
KİMYA BÖLÜMÜ

Bağış Tarihi: 16/10/1985
Univ. Kurum.
bağışdır.

KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI
İÇİN GELİŞTİRİLMİŞ BİR
AFİNİTE KROMATOGRAFİSİ METODU

Dr. E. Edip KEHA

0009230

DOÇENTLİK TEZİ
Erzurum - 1981

Atatürk Üniversitesi
Kütüphane
Dmb. No: 56410

Ö N S Ö Z

Afinite kromatografisi, son yıllarda enzim saflaştırılmaları için çok kullanılmaya başlanan bir ayırma metodudur. Diğer yollarla uzun vakit alıcı işlemler sonucu gerçekleştirilebilen izolasyon, bu yöntemle kısa bir süre içerisinde, biyolojik üniteye hemen hiç zarar vermeden yapılabilmektedir. Araştırmamızda, daha önceki yayınlarda karşılaşılanlardan farklı bir metod kullanarak karbonik anhidraz enziminin kuvvetli bir inhibitörü olan p-amino benzen sulfonamidin CM-sephadex'e kovalant bağlanmasıyla değişik bir afinite jeli hazırlanmıştır.

Dört ana bölümde toplanan bu çalışmanın "Giriş" bölümünde, enzimler ve özellikle karbonik anhidraz enzimi ve afinite kromatografisi hakkında bazı genel bilgilerin yanı sıra konumuzun amacı ile ilgili açıklamalar yapılmış; "DeneySEL Bölüm"de, kullanılan materyal ve metodlar hakkında bilgi verilmiştir. "Deney Sonuçları" kısmında ise, hazırlanan afinite jeli ile yapılan deneylerin bulguları ve ilgili grafikleri sunulmuş ve bunlar "Tartışma" bölümünde değişik yönleriyle tartışılmıştır.

Çalışmanın tamamı Erzurum Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümünde ve Tıp Fakültesi Biyokimya Kürsüsünde gerçekleştirilmiştir. Bu süre içerisinde Enzimoloji Laboratuvarının bütün imkanlarından yararlanmamı sağlayarak maddi ve manevi yardımlarını esirgemeyen A.Ü. Tıp Fakültesi Biyokimya Kürsüsü Başkanı sayın Prof. Dr. M. Münip YEĞİN'e ve kürsü elemanlarına teşekkürü borç bilirim. Ayrıca sentezleme işlemlerinde kullandığım EEDQ reaktifinden göndererek çalışmanın duraklamadan yürütmesine katkıda bulunan Ege Üniversitesi Kimya Fakültesi Biyokimya ve Mühendisliği Bölümü öğretim üyelerinden sayın Doç. Dr. Azmi TELEFONCU'ya da minnet duygularımı belirtmek isterim.

KISALTMALAR

ACD	: Asit-sitrat-dekstroz çözeltisi
BCA	: Sığır eritrosit karbonik anhidraz enzimi
CA	: Karbonik anhidraz enzimi
CM	: Karboksimetil
DEAE	: Dietilamino etil
EEDQ	: N-etoksi karbonil-2-etoksi-1,2-dihidro kinolin
HCAB	: İnsan eritrosit karbonik anhidrazı B izoenzimi
HCAC	: " " " " C "
GM	: Gradient Mixer
rpm	: Devir/dak.
Tris	: Tris (hidroksimetil) amino metan
TEMED	: N,N,N',N'-tetrametil etilen diamin

İ Ç İ N D E K İ L E R

Önsöz	
Kısaltmalar	Sayfa
1. GİRİŞ	1
1.1. Enzimler ve tarihçesi hakkında kısa bilgi	1
1.2. Karbonik anhidraz enzimi	2
1.2.1. Dağılımı ve fizyolojik önemi	2
1.2.2. Fiziksel, Kimyasal ve Kinetik özellikleri	2
1.2.3. Karbonik anhidraz aktivitesi tayin metodları	4
1.3. Afinite kromatografisi hakkında genel bilgi	4
1.4. Karbonik anhidraz enziminin afinite kromatografisi	6
1.4.1. Sulfonamidler ve karbonik anhidraz inhibisyonu	6
1.4.2. Daha önceden yapılmış olan çalışmalar	7
1.5. Araştırmanın amacı	7
2. DENEYSEL BÖLÜM	10
2.1. Kullanılan kimyasal madde ve malzemeler	10
2.2. Yararlanılan alet ve cihazlar	10
2.3. Metodlar	11
2.3.1. Protein tayini	11
2.3.2. Karbonik anhidraz aktivitesi tayini	11
2.3.2.1. CO ₂ hidrataz aktivitesi	11
2.3.2.2. Esteraz aktivitesi	12
2.3.3. Tampon çözeltilerin hazırlanması	13
2.3.4. Çözeltilerdeki enzimin konsantre edilmesi	13
2.3.5. Poliakrilamid disk jel elektroforezi	14
2.3.6. Afinite jelinin hazırlanması	15
2.3.6.1. CM Sephadex'in EEDQ ile aktifleştirilmesi ...	17
2.3.6.2. L-tirozinin CM Sephadex'e bağlanması	17
2.3.6.3. Sulfanilamidin kenetlenmesi	18
2.3.7. İnsan ve sığır eritrositlerinden ham karbonik anhidraz hazırlanması	19
2.3.7.1. Eritrositlerin ayrılması ve hemolizi	19
2.3.7.2. Hemolizattaki hemoglobinin etanol-kloroform ekstraksiyonu ile ayrılması	19
2.3.7.3. Hemoglobinin DEAE Sephadex A-50 kromatografi- si ile uzaklaştırılması	20

2.3.8. Afinite kolonunun CA tutma kapasitesinin bulunması ...	21
2.3.8.1. Kapasite tayin işlemi	21
2.3.8.2. Kolonun insan karbonik anhidrazı kapasite ta- yini	21
2.3.8.3. Kolonun sığır karbonik anhidrazı kapasite ta- yini	22
2.3.8.4. Sıcaklığın kolon kapasitesine etkisinin ince- lenmesi	22
2.3.8.5. pH'nın kolon kapasitesine etkisinin incelen- mesi	22
2.3.8.6. İyonik şiddetin kolon kapasitesine etkisinin incelenmesi	23
2.3.9. İnsan karbonik anhidraz izoenzimlerinin afinite kroma- tografisi ile ayrılması	24
2.3.9.1. Karbonik anhidrazın direkt hemolizattan ad- sorbsiyonu	24
2.3.9.2. İzoenzimleri ayırma deneyleri	24
2.3.10. Sığır böbreğinden karbonik anhidraz saflaştırılması ..	26
2.3.11. Sığır eritrosit enziminden apo karbonik anhidraz el- de edilmesi	26
2.3.12. Apo karbonik anhidrazın çinko sülfat ile tekrar akti- vasyonu	27
3. DENEY SONUÇLARI	28
3.1. Afinite kolonu	28
3.1.1. CM Sephadex'e bağlanan L-tirozin ve sulfanilamid mik- tarları	28
3.1.2. Kolonun CA tutma kapasitesi	29
3.1.2.1. İnsan ve sığır karbonik anhidrazı	29
3.1.2.2. Kolon kapasitesinin sıcaklığa bağımlılığı ...	30
3.1.2.3. Kolon kapasitesinin pH ya bağımlılığı	31
3.1.2.4. Kolon kapasitesinin iyonik şiddete bağımlılığı	32
3.2. Hemolizattan karbonik anhidrazın DEAE Sephadex A-50 ile kroma- tografisi	33
3.3. Hemolizattan insan karbonik anhidraz izoenzimlerinin kroma- tografisi	33
3.3.1. Asetazolamid elüsyonu	33

3.3.2. Cl^- iyonu elüsyonu	35
3.3.3. pH gradienti elüsyonu	36
3.3.4. İzoenzimlerin Cl^- ve N_3^- iyonları ile elüsyonu	36
3.3.5. İzoenzimlerin I^- ve SCN^- iyonları ile elüsyonu	40
3.4. Sığır böbrek karbonik anhidrazının afinite kromatografisi ..	40
3.5. Apo karbonik anhidrazın hazırlanması, ayrılması ve tekrar aktivasyonu	40
3.5.1. Apo karbonik anhidrazın hazırlanması	40
3.5.2. Apo karbonik anhidrazın afinite kromatografisi	43
3.5.3. Apo karbonik anhidrazın çinko sülfat ile tekrar aktifleştirilmesi	43
4. TARTIŞMA	45
5. ÖZET - SUMMARY	59
6. KAYNAKLAR	61

1. G İ R İ Ş

1.1. ENZİMLER VE TARİHÇESİ HAKKINDA KISA BİLGİ

Enzimler, metabolizma olaylarındaki kimyasal reaksiyonları katalizleyen protein yapısında bileşikler olarak tanımlanır. Günümüzde biyokimya bilim dalında en çok üzerinde araştırma yapılan bu konu, son yüzyılımızın gelişen tekniği ile sağlıktan endüstriyel sahalara kadar uygulama alanı bulmuştur(1,2,3,4,5).

Enzimlerle ilgili ilk çalışma 1835 yılında J.J. Berzelius tarafından diastaz üzerinde yapılmış ve enzimin in vivo olarak nişastayı sülfürik asitten daha yüksek bir verimde hidrolizlediği gösterilmiştir. 1860 yılında L. Pasteur fermentasyon olayının enzimlerce yürütüldüğünü deneylerle ispat etmiş, bu yüzden enzimler için "ferment" terimi kullanılmaya başlanmıştır. 1897 yılında E. Buchner maya hücrelerinden ekstrakte ettiği enzimlerin in vitro olarak ta fermentasyon olayını gerçekleştirdiğini gözlemiştir (1).

Enzimoloji alanında şüphesiz ki en önemli gelişme 1926 yılında J.B. Sumner'in üreaz enzimini "Jack bean" bitkisinden izolasyon sonucu kristallendirip, protein yapısında olduğunu göstermesiyle kaydedilmiştir. Daha sonraları J.Northrop, 1930-36 yılları arasında pepsin, tripsin ve kimotripsin enzimlerini kristallendirerek Sumner'in buluşlarını doğrulamıştır (1, 6,7).

Bugün yaklaşık 2000 kadar enzim bilinmektedir. Bunlardan çoğu yalnız tanımlanmış, 200 kadarı ise saflaştırılıp kinetiği incelenmiştir. Ancak yapılan gen harıtalari ve hücre içindeki kimyasal reaksiyonların çeşitliliği daha birçok enzimin keşfedilmediğini göstermektedir(2,3,4,5).

Bugün uygulamada, enzimler etkili oldukları bileşiklerin, yani substratların, sonuna "az" eki getirilerek isimlendirilmektedir. Örn: fosfataz, üreaz, lipaz, v.b. gibi. Fakat bu isimler enzimleri eksik tanımladıkları için Uluslararası Biyokimya Birliği tarafından sistematik bir sınıflandırılmaya gidilmiştir. Her bir enzim için dört rakamlı enzim kod numarası (E.C.) öngörülmüştür. Örn: E.C.2.7.1.1, hekzokinaz enzimi. Buradaki dört rakam enzimin katalizlediği reaksiyon türünü tam olarak ifade etmektedir (1,6,7).

Birçok enzim, reaksiyonlarını katalizlemek için koenzim adı verilen organik bileşiklere veya metal iyonlarına ihtiyaç duyarlar. Bunlar enzimlere ligand bağlarıyla tutunmuş olup, diyaliz yoluyla uzaklaştırılabilirler. Koenzime veya metal iyonuna bağlı haldeki enzime holoenzim, bunlardan ayrı yalnız protein kısmına apoenzim adı verilir (1,6).

1.2. KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİ

1.2.1. Dağılımı ve fizyolojik önemi

Karbonik anhidraz (karbonat hidrolizaz veya karbonat dehidrataz, E.C. 4.2.1.1) ilk keşfedilen Zn^{+2} iyonlu metaloenzimdir (8). İlk defa memelilerin eritrositlerinden saflaştırılan karbonik anhidraz (CA) genel olarak metabolik CO_2 nin transportunu sağlamanın yanısıra, birçok dokularda H^+ ve HCO_3^- in birikiminde de rol oynamaktadır. Bu dokular arasında böbrek, gastrik mukoza ve göz lensini sayabiliriz. Bunlardan başka histokimyasal metodlarla tükürük bezleri, kaslar, beyin, sinir miyelin kılıfı, pankreas, prostat ve endometrium dokularında da CA'ya rastlanmış ve bunların bazıları saflaştırılarak biyokimyasal özellikleri incelenmiştir. Balıkların solungaç ve salgı organlarında, bazı böcek ve bakterilerde, kabuklu hayvanların kabuk yapımında, alglerde ve bitkilerin fotosentetik hücre kloroplastlarında bu enzimin değişik rolleri olduğu ayrıca ispatlanmıştır. CA sözü geçen canlı hücrelerinde çoğu kez sitoplazmada çözünmüş, bazen de hücre membranına zayıfça bağlanmış olarak yer almaktadır (8,9,10,11,12,13,14).

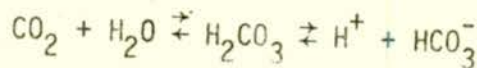
Eritrosit CA'ı, doku kılcal damarlarında metabolizma ürünü olan CO_2 i H_2CO_3 'e, akciğer pulmonar kapilerde ise H_2CO_3 'i CO_2 'e çevirerek tersinir bir reaksiyonla solunum olayında yer alır. Böbrek tübüllerinde ise, aynı reaksiyonlarla, Na^+ ve H_2O geri emilimini sağlar. Diğer dokularda da yine yukarıda belirtilen reaksiyonla ya CO_2 transferini, ya da H^+ iyonu birikimini temin ederek hücre için gerekli ortamı meydana getirir (9,10,11,15,16).

Bitki kloroplastlarındaki CA enziminin rolü henüz tam olarak aydınlatılmamakla beraber, fotosentez olayının Calvin siklüsünde önemli bir görevi olduğu tahmin edilmektedir. Nitekim CA'ın kuvvetli bir inhibitörü olan asetazolamidin (5-asetamido-1,3,4-tiyadiazol-2-sulfonamid) aynı zamanda fotosentez olayını da inhibe etmesi bu tahmini desteklemektedir (17,18,19).

CA enziminin dağılımı ve omurgalılarındaki bilinen veya muhtemel fizyolojik rolleri Maren ve Carter tarafından geniş olarak anlatılmıştır (10,11).

1.2.2. Fiziksel, Kimyasal ve Kinetik Özellikleri

Canlılarda bulunan karbonik anhidraz enzimi



reaksiyonunu katalizlemektedir. Memelilerde, bu reaksiyonu "yüksek aktiviteli" ve "düşük aktiviteli" olarak yürüten iki CA izoenzimine rastlanılmıştır, fakat ayrı ayrı fizyolojik önemleri aydınlatılamamıştır (9,10,20,21,23,25,26).

Bu izoenzimlerin aktiviteleri arasında 10 ile 130 misli kadar bir fark vardır.

Karbonik anhidraz izoenzimlerinin memelilerdeki moleköl ağırlıkları 30.000, bitki kloroplastlarından elde edilen ve hekzamerik bir yapıya sahip olan CA'nın ise yaklaşık 180.000 dalton olduğu görülmüştür (17,18,19). Bunun yanısıra, insan böbreğinde hücre zarına bağlı ve moleköl ağırlıkları 66.000 civarında olan CA izoenzimlerine de rastlanmıştır (30,31).

Bir peptid zincirinden ibaret memeli enzimleriyle, 6 altbirim zinciri ihtiva eden bitki enzimlerinde, her bir zinciri aktif bölgelerinde, ligand bağlarıyla bağlanmış bir Zn^{+2} iyonu bulundurmaktadır (17,18,19,20,30,33).

Karbonik anhidraz enzimlerinin izoelektrik pH'ları türden türe farklılık göstermekte ve aktivitesi ile bir korelasyona rastlanamamaktadır. Eritrosit izoenzimleri için izoelektrik pH, insanda 7.4 ve 5.7, atta 10.0 ve 6.0, sığırdı 5.2, domuzda 7.3 ve 5.2 ve köpek balığında 4.5 olarak literatüre geçmiştir (23,28,29,30).

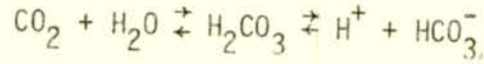
Amino asit bileşimleri yönünden benzerlik gösteren memeli, bakteri ve balık CA ları, yüksek oranda prolin, asidik bazik amino asitler ve az miktarda kükürtlü amino asitler ihtiva etmektedir. Bitki CA ları ise bunlara nisbeten daha yüksek seviyede sistein taşırlar (19,20,25,27,30,33,34).

Karbonik anhidraz enziminin CO_2 , HCO_3^- ve H_2O arasındaki reaksiyonların yanısıra, asetaldehit ve benzer bileşiklerin hidratasyonu ve muhtelif esterlerin de hidrolizini katalizledikleri görülmüştür. Enzimin, "esteraz" aktivitesini ortaya koyan bu son özelliği ile, organizmada fizyolojik bir rolü olup olmadığı henüz bilinmemektedir (32,35,36,37,38,39).

CA izoenzimlerinin kuvvetli inhibitörleri sulfonamidlerdir (59). Bu bileşiklerin özelliklerinin keşfedilmesinden sonra, ilaçlarda kullanılan daha etkili inhibitörler sentezlenmiştir. Asetazolamid (Diamox), etokzolanamid bunlara örnektir. Tek değerlikli anyonların da inhibisyon gösterdikleri bulunmuş ve sığır CA'ı ile yapılan esteraz aktivitesi deneylerinde artan etkinliğe göre F^- , Cl^- , asetat, Br^- , NO_3^- , HSO_3^- , HCO_3^- , ClO_4^- , I^- , N_3^- , SCN^- , CNO^- , HS^- , CN^- anyonlarının p-nitrofenil asetat hidrolizini inhibe ettikleri görülmüştür. Ayrıca insan eritrosit enzimlerinde, CO_2 hidratasyon reaksiyonlarında Pb^{+2} , Ag^{+1} , Zn^{+2} , Cd^{+2} ve Cu^{+2} ağır metal iyonları tarafından inhibe ve Hg^{+2} , Se^{+4} ve Co^{+2} iyonları tarafından da aktive edildikleri bulunmuştur (27,40,41,42,43).

1.2.3. Karbonik Anhidraz aktivitesi tayin metodları

Karbonik anhidraz aktivitesi enzimin CO_2 i hidratasyonu, HCO_3^- ı dehidratasyonu ve bazı esterleri hidrolizi özelliklerinden yararlanılarak belirlenmektedir.



reaksiyonunda görüldüğü gibi, ortama göre (1) CO_2 gazı açığa çıkmakta veya harcanmakta, (2) H^+ konsantrasyonu artmakta veya azalmaktadır. (1) olayı kantitatif olarak manometrik yollarla tesbit edilebilir. Fakat manometrik metodun, reaksiyon pH sınırı değişken olması, CO_2 nin suda sınırlı çözünmesi ve uzun zaman alması gibi dezavantajları vardır (45,46,50). (2) olayından yararlanılarak, belirli bir pH düşmesi veya yükselmesi için geçen süre potansiyometrik yolla veya indikatörle belirlenebilir. Fakat bu metodun, kısa zaman alması gibi bir avantajının yanı sıra, reaksiyon sırasında pH'nın değişken olması, CO_2 nin suda sınırlı çözülmesi ve kullanılan indikatörün inhibisyon etkisi gibi olumsuz sonuçları da vardır (44,47,48,49). Bu dezavantajları en az düzeye indirmek için sabit pH da titrasyon veya 0.02-0.05 birimlik pH düşüşünün indikatörlü ortamda spektrofotometre ile ölçüm yapıldığı hızlı akış reaksiyonu (rapid flow reaction) gibi metodlar enzimin K_m ve V_{max} gibi parametrelerinin bulunmasında kullanılmaktadır. Fakat enzimin pürifikasyon basamaklarında aktivite ölçümleri, genellikle bütün araştırmacılar tarafından, Wilbur-Anderson metoduyla yapılmaktadır. Bu yöntemde, CO_2 hidratasyonunda pH'nın 8.2 den 6.3 e düşüşü için geçen süre brom timol mavisi indikatörü yardımıyla bulunmakta ve enzim birimi, enzimsiz CO_2 hidratasyon süresi (t_0) ile enzimli reaksiyon süreleri (t_c) arasındaki farkın t_c ye bölünmesiyle elde edilmektedir. Yani, $E.U = (t_0 - t_c)/t_c$ dir. Spesifik aktivite ise $S.A = [10(t_0 - t_c)/t_c]/\text{mg.protein}$ formülünden hesaplanır (28,44).

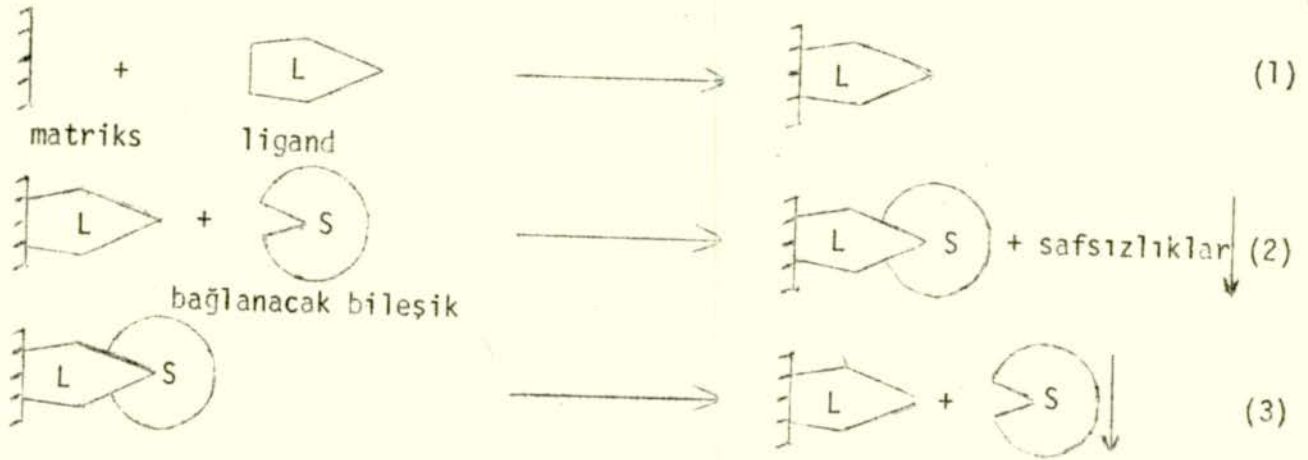
Enzimin esteraz aktivitesi ise, p-nitro fenil asetatın hidrolizinde açığa çıkan p-nitro fenol miktarının 348 nm. de spektrometrik ölçümüyle tayin edilmektedir (26,28).

1.3. AFİNİTE KROMATOGRAFİSİ HAKKINDA GENEL BİLGİ

Afinite kromatografisi bir çeşit adsorbsiyon kromatografisi olup, saf-laştırılması istenen molekül veya biyolojik ünitenin, "matriks" adı verilen çözünmeyen bir kolon maddesine kovalant olarak immobilize edilmiş bir bağlama bileşiğine (ligand), spesifik ve tersinir bağlandığı bir tekniktir. Bu sa-

yede, çok yorucu, zor ve bazı hallerde imkânsız olan birçok ayırma işlemleri kısa zamanda gerçekleştirilmekte ve yüksek bir verimde binlerce defa saflaştırılmış bileşikler elde edilmektedir (55,56,57).

Bir afinite kromatografisi kolonunun hazırlanış ve çalışması şematik olarak Şekil 1 de gösterilmiştir.



Şekil 1- Afinite kromatografisi. 1. basamakta ligand matrikse kovalant bağlanmakta, 2. de ise saflaştırılacak bileşik kolona adsorbe olup, safsızlıklar akmakta ve son 3. basamakta da bileşik elüe edilmektedir.

Afinite kromatografisi ilk defa 1910 yılında amilazın, çözünmeyen nişastaya adsorbsiyonu sonucu, izolasyonunda kullanılmıştır. Fakat, kovalant olarak ligandların bağlanabileceği dayanıklı matrislerin bulunmayışından, bu tekniğin yaygın halde uygulanması 1967 den sonra gerçekleşebilmiştir. Bu tarihte, primer amino grubuna sahip bileşiklerin siyano bromür (CNBr) ile aktive edilmiş polisakkarit matriks üzerine kovalant bağlanabileceği gösterilmiştir (55). Bu keşiften sonra afinite kromatografisinden yararlanarak, biyospesifik ligandlarla antikorlar, bazı taşıyıcı proteinler, enzimler, nükleik asitler ve hatta bir takım hücrelerde çok saf halde elde edilmeye başlanmıştır (56,57,58).

Bir afinite kolonunun verimli olabilmesi için, (1) matriksinin iyi akış özelliklerine sahip, ligand bağlama ve elüsyon işlemlerine dayanıklı ve akan bileşiklerle etkileşme yapmayan bir yapıda, (2) ligandın ise adsorbe edeceği bileşikle 10^{-4} - 10^{-8} M arasında değişen bir afinitesi olmalıdır. Birçok biyolojik bileşiklerin liganda bağlanacağı aktif bölgelerin üç boyutlu yapılarının derinliklerinde olduğu için, ligand matriksten bir "uzantı kolu" (spacer-arm) ile belli bir uzaklıkta olmalıdır. Bu sağlandığı zaman kolonun

kapasitesi artar. Uzantı kolu uzunluğu kritik bir değer olup, kısa kaldığında bağlanma verimsiz, gereğinden uzun olduğu zaman da, hidrofilik ve hidrofobik etkileşmelerle, istenmeyen bazı bileşiklerin de adsorbsiyonu olabilir (56,58). Uzantı kolunun afinite kromatografisindeki fonksiyonu Şekil 2 de şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2- Uzantı kolunun afinite kromatografisindeki rolü. (i) uzantı kolu olmadığı için bağlanma zordur. (ii) uzantı kolu bulunduğu için kolayca bağlanma olur.

1.4. KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİNİN AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ

1.4.1. Sulfonamidler ve Karbonik Anhidraz inhibisyonu

Karbonik anhidrazın saflaştırılmasından yedi yıl sonra aromatik ve heterosiklik sulfonamidlerin kuvvetli inhibitör oldukları bulunmuştur(59). Bu bileşiklerin CA'a bağlanmış hali X-ışını kristallografisi ile incelenmesi sonucu sulfonamid grubunun, hem azot, hem de iki oksijen atomundan bir tanesinin Zn^{+2} iyonu primer koordinasyon küresi içinde yer aldığı gösterilmiştir (60,61). Bugüne kadar aromatik sulfonamidlerin CA'a bağlanma derecelerinde halkanın rolü tamamen açığa çıkarılamamıştır (62). Fakat alifatik sulfonamidlerin çok zayıf inhibisyon etkilerinin olması aromatik grubun önemini göstermektedir.

Aromatik ve heterosiklik sulfonamidlerin inhibisyon sabitleri (K_i), yani afinite dereceleri, 10^{-5} ile 10^{-8} M arasında değişmektedir. Bu sabitlerin izoenzimler için farklı, pH ile değişken olması (örn: sulfanilamidin pH=8.0 de HCAB için $K_i=2 \times 10^{-5}$, HCAC için 5×10^{-6}) ve değişik tek değerlikli anyonların bu izoenzimlere bağlanma sabitlerinin bilinip, bu anyonların aynı aktif bölge için sulfonamidlerle yarışma içinde bulunması, bu bileşiklerin ideal ligand görevi yapabileceklerini göstermektedir (9,20).

CA ın aktif bölgesi globüler protein yapısının 12-15 Å derinliğinde olduğu X-ışınları kristallografisi ile belirlenmiştir (60,61). Bu durumda,

hazırlanacak afinite kolonuna, belirtilen derinliğe erişebilecek uzunlukta bir uzantı kolu bağlanmalıdır. Bu kolun uzunluğunun yanı sıra, kimyasal yapısının da enzimin adsorbsiyonunda etkili oldukları, araştırmacılar tarafından belirtilmektedir (60,61). Ayrıca sulfonamidlerin Zn^{+2} iyonu uzaklaştırılmış apo karbonik anhidraza bağlanma afiniteleri birkaç bindefa azalmaktadır. Bu özellikten faydalanarak, sulfonamid ligandı takılı afinite kolonu ile aktif haldeki CA, apo CA dan ayrılabilir (20,58,63,64).

1.4.2. Önceden yapılmış olan çalışmalar

CA ın afinite kromatografisi ilk defa (i) 1972 yılında Falkbring ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir. Daha sonra (ii) 1974 yılında Whitney'in, (iii) 1975 yılında Wistrand ve arkadaşlarının, (iv) aynı yıl Osborne ve Tashian'ın, (v) 1976 yılında Champagnol'un, (vi) 1977 de Khalifah ve arkadaşlarının ve (vii) 1980 yılında yine Wistrand ve arkadaşlarının çalışmaları görülmektedir. (v) nolu araştırmacı dışında diğerleri ligand olarak benzen sulfonamid türevleri, (v) nolu ise 2-amino-1,3,4-tiyadiazol-5-sulfonamid kullanmışlardır (65,66,67,68,69,70,95). Bu çalışmalarda matrikse takılan ligand ve uzantı kolları ile kolonların kapasiteleri Tablo 1 de gösterilmiştir.

Tablodan görüldüğü gibi bitki CA sı dışında ligand olarak benzen sulfonamid türevleri kullanılmıştır. Çünkü, bitki CA sı benzen sulfonamidleri tarafından çok az inhibe edilmektedir. Yine tabloda uzantı koluna sahip afinite kolonlarının yüksek kapasiteye sahip oldukları görülmektedir. Matrikse takılan uzantı kollarının farklı farklı olması da dikkati çekmektedir. Ayrıca kolonların, çok değişik orjinli CA ların izolasyonunda kullanılması, metodun geniş bir uygulama alanına sahip olduğunu göstermektedir.

1.5. ARAŞTIRMANIN AMACI

Bu çalışmada, karbonik anhidraz enziminin afinite kromatografisi ile saflaştırılmasında daha önceki araştırmacılardan farklı bir metodla, yüksek verimli bir afinite jeli sentezlemek istedik.

Bölüm 1.4'te ayrıntılı şekilde anlatıldığı gibi, kolona karbonik anhidraz bağlanmasında "uzantı kolu" nun büyük rolü vardır. Bu kolun uzunluğu ile beraber, kimyasal yapısı da enzim adsorbsiyonunu etkilemektedir. Bundan dolayı Tablo 1 de görüldüğü gibi araştırmacılar karbonik anhidraz afinite kromatografisinde değişik uzantı kolları kullanmışlardır. Araştırmamızda uzunluk ve kimyasal yapı yönünden bu tablodakilerden farklı bir u-

Tablo 1- Önceden yapılan çalışmalarda matrikse takılan ligand ve uzantı kolları ile bu kolonların kapasiteleri

No	Matriks	Ligand	Uzantı kolu	CA kapasitesi mg./ml.jel	Ligandın bağ.reak.	Uygulandığı can- lı ve dokular
i	Sephadex G-150 Sepharose 2B,4B,6B	p-amino benzen sulfonamid	Yok	3-4	CNBr ak- tifleşti- rilmesi	insan eritrosit, bakteri
ii	Sepharose 4B	p-aminometil ben- zen sulfonamid	Yok	<5	CNBr ak- tifleşti- rilmesi	insan eritrosit izoenzimleri
iii	Sepharose 6B	p-amino benzen sulfonamid	OH $-\text{CH}_2\text{CHCH}_2\text{O}(\text{CH}_2)_4\text{OCH}_2-$ $-\text{H}_2\text{CHCOH}$	Belirtilme- miş	oksiran aktifleş- tirilmesi	insan böbrek
iv	CM-sephadex C-50	p-amino benzen sulfonamid	$m-\text{NH}_2(\text{C}_6\text{H}_4)\text{NHCOCH}_2-$	17-23	karbodi- imid ak- tifleşti- rilmesi	insan, maymun, kedi ve köpek eritrositleri
v	Sepharose 4B	2-amino-1,3,4-ti- yadiazol-5-sulfon- amid	$\text{NH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$ $\text{NH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2)_9\text{COOH}$	Belirtilme- miş	aynı	bitki fotosente- tik hücreleri
vi	CM-Bio-Gel A	p-aminometil ben- zen sulfonamid	$-\text{CH}_2\text{CONHCH}_2-$	15-20	aynı	insan eritrosit
vii	(iii) ile aynı	(iii) ile aynı	(iii) ile aynı	(iii) ile aynı		sığır göz lensi

zantı kolu denemeyi düşündük.

Ligandın matrikse kovalant bağlanmasında, CNBr ve karbodiimid aktivasyonu, en çok kullanılan metodlardır. Birincisi ile bir ester, ikincisi ile de bir amid bağı oluşmaktadır. CNBr ile hazırlanmış bir afinite jeli, karbonik anhidraz enziminin kromatografisi esnasında, yine bu enzim tarafından ester bağının hidrolizlenmesi sonucu, verimini büyük ölçüde kaybetmektedir. Karbodiimid metoduyla afinite jelinin sentezlenmesi sırasında, kolon maddesi olan polisakkarit matriks, pH 4 civarında, yaklaşık 24 saat müddetle karıştırılmaktadır. Bu işlem jelin fiziksel yapısını büyük ölçüde bozmakta ve sonuç olarak hazırlanan kolonun akış özellikleri olumsuz yönde etkilenmektedir. Araştırmamızda, daha önceden enzim immobilizasyonunda ve peptid sentezlerinde kullanılan EEDO ile kovalant bağlanmayı temin etmek istedik. Çünkü bu bileşik ile reaksiyon iki saat içinde ve bir amid bağı oluşturarak sonuçlanmaktadır. Daha sonra, sentezlenen jelin bazı kromatografik özelliklerini araştırmayı ve değişik orijinli karbonik anhidraz enzimlerinin saflaştırılmasında ne derece yararlı olabileceğini, ortaya koymayı amaçladık.

2. DENEYSEL BÖLÜM

2.1. KULLANILAN KİMYASAL MADDE VE MALZEMELER

Araştırmamızda kullanılan CM-Sephadex-C50, DEAE-Sephadex-A50, Sephadex-G25, piridin-2,6-dikarboksilik asit, amonyum persulfat, Amido-black, brom fenel mavisi, p-nitrofenil asetat, sodyum azür ve diyaliz torbaları "Sigma Chemical Comp." (ABD) den; sodyum klorür, sodyum sülfat, sodyum nitrit, potasyum tiyosiyandır, potasyum iyodür, sodyum hidroksit, hidroklorik asit, sülfürik asit, çinko sülfat, kloroform, etil alkol, aseton, sodyum bikarbonat, sodyum karbonat, sodyum barbital, L-tirozin, sukroz ve borik asit "E. Merck AG" (B. Almanya) den; tris (hidroksimetil) amino metan, brom timol mavisi, sodyum sitrat ve sitrik asit "Fisher Scientific Comp" (ABD) den; dekstroza "Difco Lab." (ABD) den; Cyanogum-41 ve TEMED (N,N,N',N'- tetrametil etilen diamin) "E.C. Apparatus Corp." (ABD) den; N-etoksi karbonil-2-etoksi-1,2-dihidrokinolin (EEDQ) "Aldrich Comp." (ABD) ve "Sigma" (ABD) den; 5-asetamido-1,3,4-tiyadiazol-2-sulfonamid (asetazolamid) ve p-amino benzen sulfonamid (sulfanilamid) ilaç firmalarından sağlandı. Bunlardan yalnız sulfanilamid destile suda iki defa kristellendirildikten sonra, diğerleride aynen kullanıldı. Bazıları analitik, bazıları da reaktif saflıkta olan maddelerimizin çözeltileri tamamen didestile su ile hazırlandı ve kullanılan cam malzemelerin tümü didestile su ile yıkandı.

2.2. YARARLANILAN ALET VE CİHAZLAR

Çalışmamız boyunca aşağıda bazı özellikleri de verilen alet ve cihazlardan faydalandık.

Hassas terazi: Mettler H-10 CH 8606 greifence, Zürich

pH metre: Beckman, Expanded scale, model SS-2

Manyetik karıştırıcı: Jumbo Magnetic Stirrer

Santrifüj: IEC, Model CL

Yüksek devirli-sağutmalı santrifüj: IEC, Model B-20

Aspiratör: Perkin-Elmer Corp. Model 6-706 Pump assembly

Vakum pompası: Disto-pump, Model 1399, Welch Sci. Co.

Buz kırıcısı: Ice-O-Matic, Rival

Karıştırıcı: Vortex-Genie, Model K-550-GE

Diyalizatör: İki ayrı hacimde (2 ve 10 lt.) Oxford Multiple dialyzer

Gradient karıştırıcı: Gradient Mixer GM-1 Pharmacia

Fraksiyon toplayıcısı: Fraction collector, Drop counting unit, A.O. Instrument. Co.

Spektro fotometre: Beckman DU-2 spectrophotometer

Atomik Absorbsiyon spektrofotometresi: Perkin-Elmer 107, Zn Hallow Cathode Lamp, Type D/Zn

Homojenizatör: VirTis, type-Super 30

Otomatik titrasyon cihazı: Automatic Titrimeter, Model 36, Fisher Scientific Co.

Cam elektrod: Beckman Glass Electrode, pH 0-14, -5⁰-100⁰C

Jel elektroforez takımı: Electrophoresis App. GE-4 Pharmacia

Güç kaynağı: Titan Power Supply, Helena Lab.

Kromatografi Kolonları: 4x60cm ve 0,9x75cm boyutlarındaki kolonlar Corning Glassware; 3x75cm ve 1,5x75cm boyutlarındaki kolonlar Fisher Scientific Co.

2.3. METODLAR

Çalışmamızda, enzim ihtiva eden çözeltilerle yapılan bütün işlemler devamlı olarak 2⁰C sıcaklıkta tutulan suğuk odada gerçekleştirildi. İlerideki bölümlerde anlatılan deney metodları için aksi belirtilmedikçe sıcaklık 2⁰C olarak alınmalıdır.

2.3.1. Protein tayini

Kromatografi işlemleri esnasında alınan bütün fraksiyonların 280nm. de absorbansları (O.D) okunarak kalitatif protein tayini yapıldı. Proteinler yapılarındaki triptofan ve tirozinden dolayı bu dalga boyunda maksimum absorbans gösterirler (71).

Kantitatif protein tayinlerinde Lowry metodu uygulandı (72). Karbonik anhidraz miktarları ise enzimlerin 280nm. deki ekstinksiyon katsayıları kullanılarak bulundu. Bu katsayılar HCAD için $A_{1cm}^{1\%} = 16.3$, HCAC için 18.7 ve BCA için 19.0 değerindedir (73). Burada $A_{1cm}^{1\%}$ sembolü, 100 ml. çözeltide 1g. enzimin 1cm. lik ışık yolundaki optik dansitesidir.

2.3.2. Karbonik Anhidraz Aktivitesi Tayini

2.3.2.1. CO₂ hidrataz aktivitesi

Çalışmalarımız boyunca elimizdeki örnek ve fraksiyonlarda CA aktivitesi, Rickli ve arkadaşları tarafından modifiye edilen Wilbur-Anderson metoduyla belirlendi (28,44). Bu metod prensip olarak CO₂ in hidratasyonu sonucu açığa çıkan H⁺ iyonundan dolayı pH daki değişimin brom timol mavisi

indikatörü ile belirlenip, geçen sürenin ölçülmesine dayanmaktadır.

Burada uygulanan prosedür şöyle idi: pH sı 8,2 olan 0.025 M Veronal tamponundan 2ml., % 0.04 lük brom timol mavisi çözeltisinden 0.2ml. karıştırıldı ve bu karışıma enzim çözeltisinden 0.8ml. ve 0°C da doyurulmuş CO₂ çözeltisinden 2ml. ilave edildi. CO₂ çözeltisi katıldığı andan itibaren indikatörün mavi rengininsarımsı yeşile dönüşmesi (pH=6.3) için geçen süre belirlendi (t_c). Aynı süre enzim olmaksızında tesbit edildi (t_0). Buradan 1 Wilbur- Anderson Enzim Birimi = $(t_0 - t_c)/t_c$ formülünden bulundu. Reaksiyona sokulan enzim miktarı t_c 20 san. civarında olacak şekilde ayarlandı.

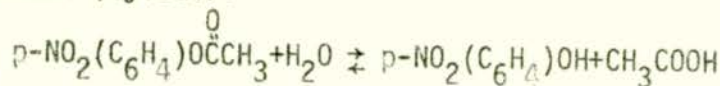
Bu deneylerde kullanılan (1) 0.025 M Veronal tamponu, 0.025 mol sodyum barbitalin 950ml. suda çözülüp, pH 8.2 ye kadar 0.1 N HCl ile titrasyonundan sonra 1 lt. ye tamamlanmasıyla; (2) CO₂ çözeltisi, kullanılmadan önce 0°C da suyun bir saat müddetle CO₂ gazına doyurulmasıyla; ve (3) %0.04 lük brom timol mavisi çözeltisi, 0.1g. indikatörün 16ml. 0.01 N NaOH da çözüldükten sonra suyla 250ml. ye tamamlanmasıyla hazırlandı (28,44,74).

Bu metod, hız sabitlerinin tayini için uygun olmamakla birlikte, saf-laştırma esnasında CA aktivitesinin kalitatif olarak belirlenmesinde, hemen hemen bütün araştırmacılar tarafından kullanılmıştır. Çalışmalarımız boyunca enzim çözeltileri ve kolon fraksiyonlarında aktivite tayini bu yolla yapıldı.

2.3.2.2. Esteraz aktivitesi

Karbonik anhidrazın esteraz aktivitesi p-nitrofenil asetatın hidrolizlenen miktarının tayini ile bulundu. Apo CA ve Zn⁺² ile tekrar aktive edilmiş enzimin aktiviteleri bu yolla belirlendi.

Metod, prensip olarak, reaksiyon karışımının üç dakika sonunda 348nm. deki absorbansının artmasından, p-nitrofenil asetatın hidrolizlenmesi sonucu oluşan p-nitrofenol konsantrasyonunun bulunmasına dayanır. 348nm., p-nitrofenol ve p-nitrofenolat iyonunun izosbestik, yani her ikisinin de aynı abzorbanşı verdikleri dalga boyudur. p-nitrofenolün molar ekstinksiyon katsayısı $\epsilon_{348nm} = 5.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ dir. Bu dalga boyunda p-nitrofenil asetatın çok az bir absorpsiyonu vardır ve $\epsilon = 0.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ dir. Eğer ölçümler 1 cm. lik küvetlerle yapılırsa 348nm. deki absorbans artışı beşe bölünmekle hidrolizlenen p-nitrofenil asetat miktarı milimolar cinsinden bulunur. Reaksiyon denklemi şöyledir:



Fenol grupları asidik olduğu için, ortamın pH'ına göre değişen oranda fenolat ve H^+ iyonlarına ayrışır. 348nm'de p-nitrofenol ve p-nitrofenolat iyonunun absorpsiyonları okunabildiği için optik dansiteler pH'ya bağımlı değildir (33,38). Aktivite ölçümlerinde su prosedürü takip edildi:

p-nitrofenil asetat substrat çözeltisi günlük olarak hazırlandı. 27.2 mg. ester 1 ml. aseton içinde çözülür ve yüksek hızla karıştırılan 49ml. suya yavaş yavaş ilave edildi. Elde edilen çözelti 3 mM olup, daha derişliğini hazırlamak esterin sınırlı çözünürlüğü sebebiyle mümkün değildir. Aseton diğer organik çözücülere nisbeten hidroliz reaksiyonunu en az inhibe eden solvent olduğu için seçildi (38). Reaksiyon pH 7.5'te, 0.05 M Tris- SO_4 çözeltisiyle tamponlandı.

3 ml. lik reaksiyon küvetine 1.5 ml. tamponlanmış enzim çözeltisi ve 1.5 ml. substrat konulmasından 3 dak. sonra, 25°C'de, absorpsiyon okundu. Spektrometre daha önceden enzimsiz reaksiyon karışımının 3 dak. sonundaki absorpsiyon ile sıfıra ayarlandı. Bu surette 3 dak. içinde esterin kendi kendine hidrolizlenen kısmı için düzeltme yapılmış oldu. Reaksiyonda parçalanmış ester miktarı şöyle hesaplandı:

$$5.4 \times 10^{-3} - 0.4 \times 10^{-3} = 5.0 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ (p-nitrofenolün gözlenen } \epsilon \text{ si)}$$

$$\text{p-nitrofenol miktarı} = \frac{\Delta(0.0)}{5.0 \times 10^{-3}} = \frac{\Delta(0.0)}{5.0} \times 10^{-3} \text{ M/3 dak.} = \frac{\Delta(0.0)}{5.0} \text{ mM}$$

2.3.3. Tampon çözeltilerinin hazırlanması

Kromatografi işlemleri esnasında çeşitli Tris tamponları kullanıldı. Bunlardan yalnız iki tanesi hazırlanışı diğerlerine örnek olarak anlatılacaktır.

(i) 0.05 M Tris-HCl tamponu pH=8.7

6.057 g. (0.05 mol) Tris tartıldı ve 950 ml. suda çözülür. 1 N HCl ile pH=8.7'ye titre edildikten sonra suyla 1 lt. ye tamamlandı.

(ii) 0.1 M Tris- SO_4 /0.2 M Na_2SO_4 tamponu pH=9.0

12.11 g. Tris (0.1 mol) ve 28.4 g. Na_2SO_4 (0.2 mol), 950 ml. suda çözülür. 1 N H_2SO_4 ile pH=9.0'a kadar titre edilip, suyla 1 lt. ye tamamlandı.

2.3.4. Çözeltilerdeki enzimin konsantrasyonunun artırılması

Denemelerimiz sırasında büyük hacimli enzim çözeltilerinin hacimlerini azaltmak, bir başka anlamda enzim konsantrasyonunu artırmak için Sephadex maddesinin su absorpsiyonu özelliğinden yararlanıldı.

Konsantre edilmesi gereken enzim çözeltisine istenilen hacmi sağlayacak miktarda Sephadex-G25 kuru jelinden ilave edildi. Üretici firma tarafından bildirildiği gibi, kendi hacminin 5-6 misli kadar su absorbe eden bu bileşiğin gözeneklerine, molekül ağırlığı 5000 üzerinde olan peptid zincirleri girememektedir. Enzim çözeltisinden jel, Buchner hunisi ile süzülerek uzaklaştırıldı ve bol su ve asetonla yıkandıktan sonra etüvde 100°C - 120°C sıcaklıkta kurutuldu. Kuru jel ilerideki denemelerde yine kullanıldı.

Enzim çözeltilerinin konsantre edilmesinde uygulanan bir diğer metod da, diyaliz torbasına doldurulan çözeltinin kristal sukroz içine konulup, suyunun difüzyon yoluyla dışarıya çıkması sonucu hacmin azaltılmasıydı. Bu yolla hacmi 3-4 kez azaltılan enzim çözeltisi, destile suya karşı diyalizlenerek şekerden arıtıldı (19,79).

2.3.5. Poliakrilamid disk jel elektroforezi

Poliakrilamid jel elektroforezi, proteinleri, molekül ağırlıklarına, elektriksel yüküne ve üç boyutlu şekillerine göre ayıran bir tekniktir (78, 80, 81, 82, 83, 84). Bu metodla enzimlerin saflığı kontrol edilebildiği gibi, molekül ağırlıkları ve alt birim sayısı da belirlenebilir.

Jel, akrilamidin, çapraz bağlayıcı olarak kullanılan N,N-metilen bis akrilamid tarafından polimerize edilmesiyle hazırlanır. Bu reaksiyon, fotokatalizör etkisi olan riboflavin-N,N,N',N'-tetrametil etilen diamini (TEMED) veya amonyum persülfat-TEMED karışımları tarafından katalizlenir.

Çalışmalarımızda disk jel elektrofozezi Davies metoduna göre yapıldı ve % 7.5 luk poliakrilamid jeli kullanıldı (84). Jelin hazırlanışı E.C. Apparatus Corporation kataloğuna göre ve Cyanagum-41 ile yapıldı (85). Cyanagum-41 % 95 akrilamid ve % 5 bisakrilamid karışımıdır.

Jel tamponu olarak kullanılan 0.034 M borat çözeltisi, 2.11 g. borik asitin 800 ml. suda çözülüp, 2 M NaOH ile pH sı 9.0 a getirildikten sonra su ile bir lt. ye tamamlanarak, elektrod tamponu olan 0.34 M borat çözeltisi ise 21.1 g. borik asitin 800 ml. suda çözülüp, 2 M NaOH ile pH sı 9.0 a ayarlanıp, hacmi su ile 1 lt. ye getirilerek hazırlandı.

Jel için üç ayrı çözelti yapıldı: 1. çözelti 15 g. Cyanagum-41, 2. çözelti 0.23 ml. TEMED ve 3. çözelti ise 0.6 g. amonyum persülfatın jel tamponuyla 100 ml. ye tamamlanması sonucu elde edildi.

2 hacim 1., 1 hacim 2. ve 1 hacim da 3. çözeltilerden hazırlanan karışım, 0.6x7 cm. lik tüplere üstten 1 cm. boşluk kalıncaya kadar dolduruldu. Düzgün bir jel yüzeyi sağlamak için 0.5 ml. saf su jele karıştırılmadan enjek-

törle ilave edildi ve polimerizasyon için UV lambası altında 15 dak. tutuldu. Daha sonra üsteki su süzgeç kâğıdına emdirilerek alındı. Tüplere uygulanan örnek, % 5 lik sukroz çözeltisinden 0.7 ml., % 0.05 lik brom fenol mavisinden (öncül bileşik) 0.1 ml. ve enzim çözeltisinden 0.2 ml. karıştırılarak hazırlandı ve bu karışımdan 0.2 ml. polimerleşmiş jelin üzerine konuldu. % 5 lik sukroz çözeltisi sayesinde elektrod tamponundan daha yoğun bir ortam oluşturulmuş ve enzimin tampon içerisine dağılması önlenmiş oldu.

Elektroforez işlemi tüp başına 2 mA ile başlatıldı ve örneğin tamamen jele girmesinden sonra akım 5 mA e çıkarıldı. Öncül bileşik brom fenol mavi si anod ucuna 3 mm. yaklaşıncaya kadar akım verilmeye devam edildi. Daha sonra jeller tüpten dikkatle çıkarılarak % 7 lik asetik asit çözeltisinde % 1 lik Amido Black protein boyasında bir saat tutuldu. Boyanan jeller tekrar tüplere sokuldu ve % 7 lik asetik asit çözeltisi içinde ve akımın yönü değiştirilerek tüp başına 5 mA akım altında elektroforez uygulandı. Bu işlem sonucunda boyanan protein bantları dışındaki fazla boya uzaklaştırıldı. Jeller % 7 lik asetik asit çözeltisi içinde ve soğukta saklandı (84,85,86).

Bazı jellerde CA aktivitesi gösteren bantlarda belirlendi. Bunun için, boyama işleminden önce jel tel ile ikiye yarıldı. Bir yarısı boya tüpüne konularak boyandı ve diğer yarısı da aktivite tayini için ayrıldı. CA aktivitesi veren bantlar şöyle belirlendi:

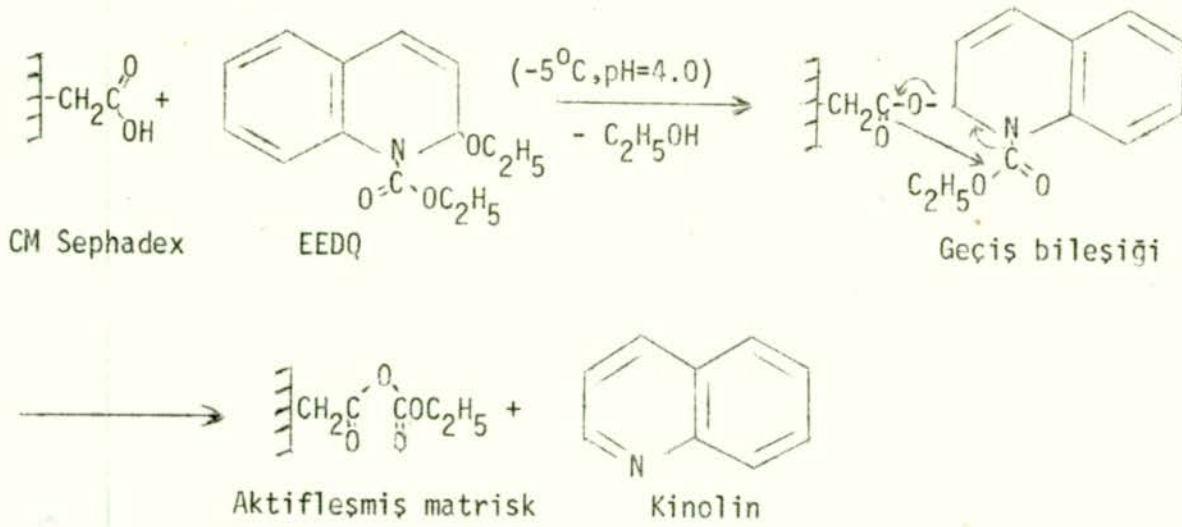
0.025 M Veronal tamponunda (pH=8.2) % 0.1 lik brom timol mavisini çözeltisine batırılmış süzgeç kâğıdı jelin üzerine örtüldü. 5 dak. içinde maviye boyanan jele CO₂ gazı püskürtülerek, enzim bulunan bölgeler rengin sarımsı yeşile dönmesiyle tayin edildi. Bu bölgeler jelin boyanan diğer yarısındaki protein bantlarıyla karşılaştırıldı.

Çalışmamızda, poliakrilamid disk jel elektroforezi ayrılan izoenzimlerin saflık kontrolünde ve henüz saflaştırılmamış enzimce zengin çözelti bantlarında CA aktivitesi veren bölgelerin belirlenmesinde kullanıldı. Elde edilen jellerin fotoğrafları, kontrolü yapılan elüsyonların grafikleriyle beraber 3. bölümde gösterildi.

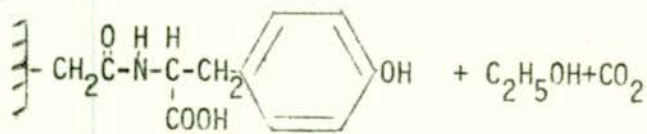
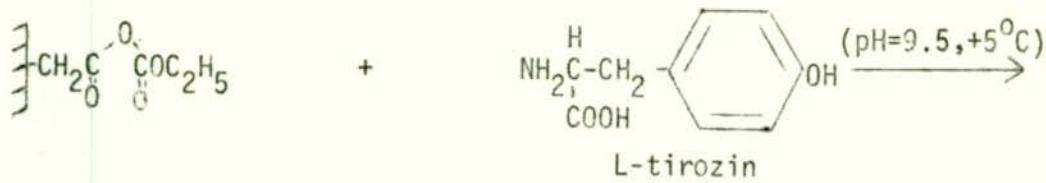
2.3.6. Afinite jelinin hazırlanması

Afinite kolonu jelinin sentezlenmesi prosedürlerine geçmeden önce, metodumuzda gerçekleştirilen reaksiyonlar, açık formülleriyle, aşağıda verilmiştir.

1- CM-Sephadex'in aktifleştirilmesi

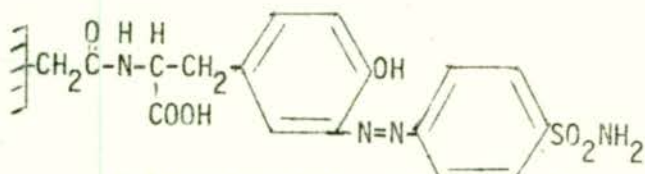
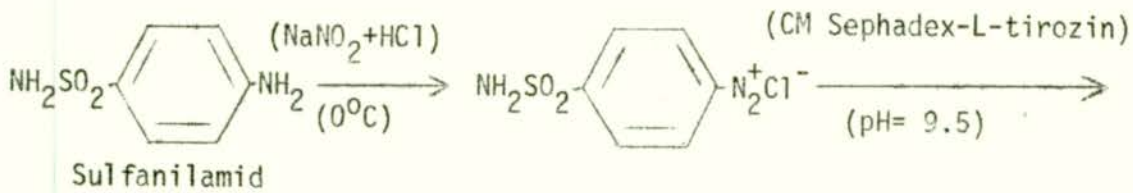


2- Aktifleşmiş matrikse L-tirozin takılması



CM Sephadex - L-tirozin

3- Sulfanilamidin diazolanıp,kenetlenmesi



Sulfanilamid kenetlenmiş jelin son durumu

2.3.6.1. CM Sephadex'in EEDQ ile aktifleştirilmesi

Yapısında serbest karboksil grubu bulunduran polisakkaritlerin N-etoksi karbonil-2-etoksi-1,2-dihidrokinolin (EEDQ) ile aktifleştirilmesi ilk kez 1974 yılında, enzimlerin serbest amino uç ve gruplarından immobilizasyonu amacıyla gerçekleştirildi (75). Aynı metod tarafımızdan L-tirozinin CM Sephadex'e kovalant bağlanmasında kullanıldı. CM Sephadex, 1g. kuru ağırlığında 4.5 ± 0.5 mmol serbest karboksil grubu ihtiva eden, dekstran yapısında bir polisakkarittir.

Aktifleştirme şu şekilde yapıldı: 1.0g. CM Sephadex -C50 , 50 ml. % 10 luk aseton çözeltisine konularak iki gün süre ile 2°C da şişmeye bırakıldı. Daha sonra tuzlu buz yardımıyla -5°C a soğutulan jelin pH sı, 0.5N HCl ile 4.0 e ayarlandı. 1.5 g. EEDQ nun (6.1 mmol) 15 ml. % 20 lik aseton-daki çözeltisi damla damla, devamlı karıştırılan jel süspansiyonuna ilâve edildi. Bu esnada pH daki yükselme, Otomatik Titrasyon Cihazında 0.5N HCl eklenmesiyle engellenerek, 4.0 te sabit tutuldu. Reaksiyon 20-30 dakikada tamamlandıktan sonra pH, derişik HCl ile 1.0 e düşürüldü ve tepkimeye girmemiş olan EEDQ nin parçalanması için 90 saniye kadar bekletildi. Derhal Buchner hunisine alınarak süzülen jel, -5°C daki 250 ml. % 10 luk aseton içinde 0.1 N HCl çözeltisiyle yıkandı. Böylece aktifleştirilen CM Sephadex hiç bekletilmeden L-tirozin çözeltisiyle karıştırılarak bağlanma sağlandı (75,76).

2.3.6.2. L-tirojinin CM Sephadex'e bağlanması

1.0 g. L-tirozin (5.5 mmol) pH sı NaOH ile 9.5 a ayarlanmış 100 ml. 0.1 M NaHCO_3 çözeltisinde çözöldü. Aktifleştirilmiş CM Sephadex ile birleştirildi. En yavaş tempoda karıştırılan suspansiyondan, bağlanma derecesini öğrenmek için, her 15 dakikada, içinde jel bulunmayan 0.2 ml. örnek alındı ve 1 M NaOH çözeltisiyle 20 ml. ye tamamlanarak 293.5 nm. de absorbans belirlendi (71). 90. dakikadan sonra bu absorbanslarda önemli bir değışme olmadığından, bağlanma reaksiyonu süresi 90 dak. olarak alındı. Bağlanan L-tirozin miktarı şöyle hesaplandı:

$(0.D)_0$ = reaksiyon öncesi çözeltinin absorbansı

$(0.D)_{90}$ = 90. dakikadaki absorbans

$[(0.D)_0 - (0.D)_{90}] / (0.D)_0$ = bağlanan L-tirozin oranı

mol L-tirozin / g. kuru jel = (bağlanan L-tirozin oranı) (1.0) / 181

L-tirozinin molekül ağırlığı 181 dir.

Daha sonra jel, Buchner hunisine alınarak bol miktarda destile su ile yıkandı.

2.3.6.3. Sulfanilamidin kenetlenmesi

0.350 g. sulfanilamid 30 ml. 1.5 M HCl de çözüldü ve 0.95 g. NaNO_2 in, 20 ml. sudaki çözeltisi damla damla ilâve edildi. Karışımın sıcaklığı tuzlu buz yardımıyla 0°C ın altında tutularak 10 dak. çalkalandı. Bu esnada L-tirozin takılı jel 100 ml. 0.2 M Na_2CO_3 çözeltisine konuldu ve pH, 1 N NaOH ile 9.5 a getirildi. Hazırlanan bu jel süspansiyonuna diazolanmış sulfanilamid çözeltisi damla damla ilave edilirken, pH da, Otomatik Titrasyon Cihazından NaOH akıtılmasıyla, 9.5 ta sabit tutuldu (56). L-tirozinin fenol hal-kasına azo bağıyla oluşan kenetlenme sonucu, jelin rengi kırmızıya döndü. Üç saat süre ile karıştırılan renkli süspansiyon Buchner hunisinde süzildükten sonra, bol miktarda didestile su ve 250 ml. 0.1 M Tris- SO_4 tamponu (pH=9.0) ile yıkandı. Su ile yıkanma sırasında jelden, elementel analiz için, bir miktar numune alındı ve üç gün süre ile suyu 6 kez değiştirilerek 10 ml destile suda tutuldu. Böylece gözeneklerine girmesi muhtemel artıklar uzaklaştırıldı. Daha sonra etüvde $100-110^\circ\text{C}$ arasında iyice kurutulan jelde, elementel analizle azot yüzdesi tayin edildi. Buradan kenetlenen sulfanilamid miktarı şöyle hesaplandı:

$$\%N = \frac{\text{bağlı tirozindeki N(mg)} + \text{bağlı sulfanilamiddeki N(mg)}}{1000 \text{ mg.kuru jel} + \text{bağlı tirozin(mg)} + \text{bağlı sulfanilamid(mg)}} \times 100$$

Burada % N elementel analiz sonucu, bağlı tirozin de bir önceki bölümde anlatılan şekilde bulunduğuna göre, bağlı sulfanilamid mmolünü X' alarak, denklemi ilk hazırladığımız jelin sonuçlarına göre yazalım.

$$2.49 = \frac{1.99 \times 14 + X \times 3 \times 14}{1000 + 1.99 \times 181 + 172X} \times 100$$

Burada, 2.49 % N; 1.99 bağlı tirozin mmol(Tablo 2); 181 ve 172 sırasıyla L-tirozin ve sulfanilamid molekül ağırlıklarıdır. Bağlı olan bir molekül sulfanilamid üç azot atomu taşıdığı için, 3 ile çarpıldı.

Yukarıda prosedürünü verdiğimiz metodu kullanarak, 4 ayrı deneyle, 6.0 gram kuru CM Sephadex'den afinite jeli hazırlandı. Herbirinde bağlı L-tirozin ve inhibitör miktarları Tablo 2 de gösterildi. İlerideki kapasite tayini deneylerinde kullanılmak üzere ençok sulfanilamid bağlı jel ayrıldı ve diğerleri birleştirildi.

2.3.7. İnsan ve sığır eritrositlerinden ham karbonik anhidraz hazırlanması

100 ml. insan kanında 14-16 g. hemoglobin bulunmaktadır (77). Eritrositlerdeki karbonik anhidraz enzimi ise, hemoglobinin yaklaşık % 1 i kadardır (33). Hazırlanan afinite jelinin kapasite tayinlerinde kullanılmak üzere, enzimce zengin karbonik anhidraz çözeltileri elde etmek için, hemoglobin iki yolla uzaklaştırıldı. Eritrosit hemolizatlarının hazırlanışı anlatıldıktan sonra, sözü geçen ayırma metodları da ayrıntılı olarak açıklanacaktır.

2.3.7.1. Eritrositlerin ayrılması ve hemolizi

Deneylerimiz için insan kanı Atatürk Üniversitesi, Araştırma Hastanesi Kan Bankasından, sığır kanı ise Erzurum Et Kombinasından kesim esnasında alındı. Antikoagulant olarak kullanılan asit-sitrat-dekstrozu (ACD) çözeltisi, 22 g. sodyum sitrat dihidrat, 8 g. sitrik asit ve 24 g. dekstrozu su ile 1 lt. ye tamamlanıp çözülmesiyle elde edildi. 100 ml. kana bu çözeltiden 15 ml. ilave edilerek, hem pıhtılaşma önlenmiş, hemde eritrositler için bir beslenme ortamı sağlanmış oldu (78). Kanlar alındıktan sonra 4°C da saklandı, 2-3 gün içinde kullanıldı.

Eritrositleri ayırmak için kan, 30 ml. lik polietilen tüplere dolduruldu ve 1500 rpm. de 15 dak. santrifüj edildi. Tüplerin üstte kalan plazma ve lökosit tabakaları aspiratörle alındıktan sonra, eritrositler % 0.9 luk NaCl çözeltisiyle iki kez yıkandı ve santrifüjlendi. Bu işlemler sonucu, 100 ml. kandan 35-40 ml. eritrosit elde edildi. Daha sonra, eritrositler bir beherde birleştirilerek hacımlarının 1.5 misli su ilavesiyle hemoliz edildi (28,29,33). Hemolizin, yani alyuvarların parçalanmasının tam olması için 1 saat süre ile karıştırıldı ve hemoglobinin ayrılması işlemlerine geçildi.

2.3.7.2. Hemolizattaki hemoglobinin etanol-kloroform ekstraksiyonu ile ayrılması

Bu metod prensip olarak, hemoglobinin etanol ve kloroformla denatüre edilip çökeltilmesi esasına dayanmaktadır (33). İnsan ve sığır hemolizatlarına uygulanan metod şöyleydi:

1 hacım hemolizata, -15°C sıcaklığında 0.25 hacım % 95 lik etanol yavaş yavaş ilâve edildi ve daha sonra 0.31 hacım soğuk kloroform eklendi. Süspansiyon 15 dak. karıştırıldıktan sonra macun kıvamına geldi ve bu şekilde

15 dak. bekletildi. Vizkoziteyi azaltmak için, yaklaşık 0.2 hacim % 0.9 luk NaCl çözeltisi eklendi. Süspansiyon, daha sonra polietilen tüplere alınarak 1000 rpm. de 15 dak. santrifüjlendi. Üst taraftaki pembemsi renkte ve enzim içeren kısımlar birleştirildi. Çökelek ve kloroform fazı atıldı. Toplanan enzim çözeltisi süzüldü ve destile suya karşı, suyu üç kez değiştirilerek, bir gece süreyle dializ edildi. Sonra, çözeltideki enzim, pH=6.7 de, katı amonyum sülfatla (60 g./100 ml. çözelti) çöktürüldü ve bir gece soğukta bekletildikten sonra süzüldü. Ayrılan enzim çökeleği süzgeç kâğıdı üzerinde, kullanılıncaya kadar, derin dondurucuda saklandı. Bu metodla, hemolizattaki karbonik anhidrazın % 40 ı hemoglobinden ayrılmış oldu (28,33).

2.3.7.3. Hemolizattaki hemoglobinin DEAE Sephadex-A50 kromatoğrafisi ile uzaklaştırılması

Bu metod, hemoglobinin DEAE Sephadex-A50 tarafından seçimli adsorpsiyonu prensibine dayanmaktadır. Çalışmamızda, bu yöntem yalnız insan kanına uygulanabildi. Çünkü, sığır kanı ile yapılan denemede enzim çözeltilerinin fazla miktarda hemoglobin taşıdığı gözlemlendi.

250 ml. insan kanındaki hemoglobinin uzaklaştırıp, enzimce zengin çözelti hazırlanmasında şu prosedür takip edildi:

Belirtilen miktardaki kandan elde edilen hemolizatta, yıkama ve eritrositleri ayırma işlemleri sırasında ortaya çıkan kayıplar gözönüne alındığı zaman, yaklaşık 30 g. kadar hemoglobin bulunmaktadır. DEAE Sephadex-A50 nin kapasitesi 5 g. hemoglobin / 1 g. kuru jel olduğu ve kapasitenin % 80 i kullanılacağı için 7.5 g. kuru jel tartıldı. Üretici firmanın direktiflerine uyarak 0.1 M NaOH ile yıkadıktan sonra Buchner hunisinde bol sudan geçirildi (79). Behere alınan jel pH sı 8.7 olan 0.05 M Tris-HCl tamponunda 4 saat karıştırıldı ve pH daki yükselme Otomatik Titrasyon Cihazından 1 N HCl ilavesiyle önlendi. Daha sonra yine Buchner hunisinde aynı tamponla yıkandıktan sonra 1 gün süreyle bu tamponda bekletildi ve 4x60 cm. lik kolona dolduruldu. Jel yer çekimi ile çökmeye bırakıldı ve çökmeden sonra 15 cm. lik bir yükseklik elde edildi. Üst kısımda 2 mm. kalıncaya kadar tampon akıtıldı ve böylece, kolon kromatografi için hazır duruma getirildi.

Hemolizat ise, önce eritrosit hücre zarlarının ayrılması için 6500 rpm. de 45 dak. süreyle santrifüjlendi ve bir gece didestile suya karşı, suyu iki defa değiştirilerek dializ edildi. pH sı katı Tris ile 8.7 ye getirildi ve hazırlanan kolona dikkatle akıtıldı. Kolon musluğu 15 ml./saat lik bir akış için ayarlandı ve hemolizatın kolona girişi de yaklaşık bu hız-

da oldu. Hemoglobinin tamamı kolon tarafından adsorbe edildikten sonra karbonik anhidraz, aynı akış hızında, 0.1 M Tris-HCl (pH=8.7) tamponuyla elüe edildi. Elüatlar damla sayıcısına bağlı otomatik fraksiyon toplayıcısı vasıtasıyla, 5 ml. hacimde, tüplere toplandı. 280 nm. deki absorbansları ölçülerek, absorbans verenlerde aktivite tayini yapıldı. Fraksiyonlarda belirlenen optik dansite ve aktiviteler tüp sırasına göre grafiğe çizildi (grafik 5). CA aktivitesine sahip olan elüatlar birleştirildi ve hemolizattaki CA'nın yaklaşık %82 sinin hemoglobinsiz olarak ayrıldığı anlaşıldı. Çözeltideki enzim amonyum sülfatla çöktürüldü ve bir gün bekletildikten sonra süzülerek ayrıldı. Kullanılincaya kadar derin dondurucuda saklandı.

2.3.8. *Afinite kolonunun karbonik anhidraz tutma kapasitesinin bulunması*

Karbonik anhidraz enziminin benzen sulfonamidlerle bağlanmasına izoenzim çeşidi, pH, sıcaklık, iyonik şiddet ve benzen üzerindeki süstituentler etki etmektedir (9). Bundan dolayı, hazırlanan afinite jelinin kapasitesi tayin edilirken, bu faktörlerin etkiside incelendi.

2.3.8.1. *Kapasite tayin işlemi*

Hazırlanan jelden yaklaşık 2 ml. alındı ve kromatografinin yapılacağı tamponda çözeltisi üç defa değiştirilerek dengelendi. Daha sonra, süzülen jel, aynı tamponun 50 ml. sinde çözölmüş olan, yaklaşık 100 mg. enzim çözeltisinde, iki saat süre ile karıştırılarak enzime doyuruldu ve 0.9x25 cm. lik kolona aktarıldı. Enzimin fazlası, elüatlar 280 nm. de absorbans veremeyinceye kadar tamponla yıkandı. Bağlanmış olan CA, 0.4 M NaN_3 /0.1 Tris- SO_4 (pH=7.5) çözeltisiyle elüe edildi ve miktarı belirlendi. Jel dahasonra, önceden tartılan bir G-3 krozesine alındı ve vakuma bağlanarak asetonla yıkayıp kurutuldu (67). Kurutmanın tam olması için 100-110°C da bir süre bırakıldı ve tartıldı. Buradan, jelin 1 g. kuru ağırlığının CA tutma kapasitesi hesaplandı.

2.3.8.2. *Kolonun insan karbonik anhidrazı tutma kapasitesinin tayini*

İnsan karbonik anhidrazı başlıca B ve C izoenzimlerinden ibarettir. Bundan dolayı, bölüm 2.3.9 da anlatılan şekilde saflaştırılan her iki izoenzim için, ayrı ayrı kapasite tayini yapıldı. Ayrıca ham CA dan hazırlanan çözeltilerle de jelin enzim tutma derecesi belirlendi.

CA çözeltileri, amonyum sülfat çökeltilerinin destile suda çözölüp,

dializlenmelerinden sonra, gerekli tampon oluşturularak hazırlandı. Böylece, amonyum sülfattan dolayı ortaya çıkabilecek iyonik şiddet farklılığı önlenmiş oldu. 0.1 M Tris-SO₄ (pH=9.0) tamponunun kullanıldığı deneyler iki kez tekrarlandı ve yüksek olan değer alındı (Tablo 3).

2.3.8.3. Kolonun sığır karbonik anhidrazı kapasitesi tayini

Hazırlanan kolonla sığır karbonik anhidrazı izoenzimleri ayrılama-
dığı için kapasite tayinleri ham enzim çözeltileriyle yapıldı. Tampon çö-
zeltisi olarak yine pH sı 9.0 olan 0.1 M Tris-SO₄ kullanıldı ve deneme iki
kez tekrarlanarak yüksek olan değer alındı (Tablo 3).

2.3.8.4. Sıcaklığın kolon kapasitesine etkisinin incelenmesi

Bu deneyler insan izoenzimleri ve sığır enzimi ile yapıldı ve tam-
pon olarak pH 9.0 da 0.1 M Tris-SO₄ çözeltisi kullanıldı. 2⁰, 5⁰, 10⁰, 15⁰, 20⁰
ve 25⁰C taki sıcaklıklarda belirlenen kapasitede grafik ve tabloda gösteril-
di (Grafik 2 ve Tablo 4).

2.3.8.5. pH'nın kolon kapasitesine etkisinin incelenmesi

Bu bölümdeki deneyler de, yine insan izoenzimleri ve sığır enzim-
leriyle pH sı 6 ile 10 arasında değişen 0.1 M Tris-SO₄ tamponunda gerçek-
leştirildi. Bu tamponun değişik pH lardaki iyonik şiddeti farklı olacağıın-
dan, çözeltilere Na₂SO₄ ilâve edilerek, pH=6.0 daki iyonik şiddet olan
I=0.149 da sabit tutuldu. Eklenecek Na₂SO₄ miktarı şöyle hesaplandı:

$$pOH = pK_b + \log [tuz]/[baz]$$

$$14 - pOH = 14 - pK_b - \log [tuz]/[baz]$$

$$pH = pK_a + \log [baz]/[tuz]$$

Tris⁰ = baz, Tris⁺ = tuz olarak gösterildiğinde ve Tris için pK_a = 8.1
olduğuna göre pH=10.0 için:

$$10 = 8.1 + \log [Tris^0]/[Tris^+]$$

Tris⁺ + Tris⁰ = 0.1 M olduğundan

$$10 = 8.1 + \log [Tris^0]/[0.1 - Tris^0] \quad \text{yazılır.}$$

$[Tris^0] = 0.0987 \text{ M}$ ve $[Tris^+] = 0.0013 \text{ M}$ olarak bulunur. Tuz, $[Tris^+]_2SO_4$ şeklinde olup, bu durumda $[Tris^+] = 0.0013 \text{ M}$ ve $[SO_4^{2-}] = 0.00065 \text{ M}$ değerindedir.

İyonik şiddet, $I = \frac{1}{2} \sum M_i Z_i^2$ olup, burada M_i iyonun konsantrasyonu, Z_i ise iyon yükünün mutlak değeridir.

$$I = \frac{1}{2} (M_{Tris^+} \times Z_{Tris^+}^2 + M_{SO_4^{2-}} \times Z_{SO_4^{2-}}^2)$$

$$= \frac{1}{2} (0.0013 \times 1^2 + 0.00065 \times 2^2) = 0.00195$$

Aynı hesaplama pH = 6.0 daki 0.1 M Tris- SO_4 çözeltisi için yapıldığı zaman $I = 0.14881$ bulunur. İki ayrı pH daki iyonik şiddet farkı

$$\Delta I = 0.14881 - 0.00195 = 0.14686$$

dır. $\Delta I = 0.147$ alındığı zaman bu iyonik şiddet farkını ortadan kaldıracak Na_2SO_4 konsantrasyonu şöyle bulunur:

$$0.147 = \frac{1}{2} (M_{Na^+} \times Z_{Na^+}^2 + M_{SO_4^{2-}} \times Z_{SO_4^{2-}}^2)$$

$M_{SO_4^{2-}} = M_{Na_2SO_4}$ ve $M_{Na^+} = 2 M_{Na_2SO_4}$ olduğuna göre, yukarıda yerine konularak

$[Na_2SO_4] = 0.049 \text{ M}$ bulunur. pH 10.0 da 0.1 M Tris- SO_4 tamponunun 1 lt. sinde $0.049 \times 142 = 6.96 \text{ g.}$ Na_2SO_4 bulunduğu zaman, bu çözeltinin iyonik şiddeti, pH sı 6.0 olan 0.1 M Tris- SO_4 tamponuyla aynı olacaktır.

pH sı 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0 ve 9.5 değerine sahip tamponlara da ilâve edilecek Na_2SO_4 miktarları aynı yolla hesaplandı. Afinite jelinin belirtilen pH lardaki kapasiteleri tayin edildi ve Grafik 3 ve Tablo 5 te gösterildi.

2.3.8.6. İyonik şiddetin kolon kapasitesine etkisinin incelenmesi

pH=9.0 ve 2°C sıcaklıkta, yine aynı enzimlerle yapılan bu deneylerde, iyonik şiddet 0.05 ile 0.25 arasında değiştirildi. 0.1 M Tris- SO_4 tamponunun farklı iyonik şiddetdeki çözeltileri bir önceki bölümde anlatıldığı gibi, hesaplanan miktarda Na_2SO_4 ilavesiyle hazırlandı. Elde edilen sonuçlar Tablo 6 ve Grafik 4 de gösterildi.

2.3.9. İnsan karbonik anhidraz izoenzimlerinin afinite kromatografisi ile ayrılması

İnsan karbonik anhidrazının sulfonamidlere olan afinitesi pH ile değişmekte ve C izoenzimi B'ye nazaran daha kuvvetli bağlanmaktadır. Fakat bu bağlanmanın pH ya bağımlılığı, her iki izoenzim için de farklıdır. Bunun yanısıra, tek değerlikli anyonların izoenzimlere olan ilgisi, düşük pH lar-da artmakta ve aynı pH da HCAB ye daha çok olmaktadır (20). Bu özelliklerden yararlanarak, değişik elüsyon çözeltileri ile izoenzimleri seçimli olarak kolondan almak mümkün olacaktır.

2.3.9.1. Karbonik anhidrazın direkt hemolizattan adsorbsiyonu

Herbir ayırma deneyinden önce, izoenzim karışımı afinite jeli tarafından doğrudan doğruya hemolizattan adsorbe edildi. Bu işlem şöyle gerçekleştirildi:

0.1 M Tris- SO_4 (pH=9.0) tamponuyla dengelenmiş 20 ml. jel, daha önceden eritrosit zarları uzaklaştırılmış ve pH sı katı Tris ile 9.0 a getirilmiş olan hemolizatla birleştirildi. CA adsorbsiyon derecesini belirlemek için, karıştırılan hemolizattan her 15 dak.da 0.2 ml. örnek alındı ve CO_2 hidrataz aktivitesi tayin edildi. 75.dakikadan sonra aktivitede önemli bir değişme gözlenmediğinden jelin enzime doyurulması için karıştırma süresi 75 dak. olarak alındı (Grafik 6). Daha sonra, süspansiyon Buchner hunisine alınarak süzüldü ve süzüntüde hemoglobinin kırmızı rengi görülmeyinceye kadar başlangıçtaki tampon ile yıkandı. Hemoglobinden temizlenmiş jel, 30 ml. tamponla karıştırılıp, 1.5x75 cm. lik kolona aktarıldı. Tamponun fazlası akıtıldıktan sonra, adsorblanmış diğer proteinleri uzaklaştırmak için, elüatlar 280 nm. de absorbans vermeyinceye kadar aynı tamponun 0.2 M Na_2SO_4 çözeltisiyle yıkandı. Bu safhadan sonra izoenzimleri ayırma işlemine geçildi.

2.3.9.2. Izoenzimleri ayırma deneyleri

İnsan CA izoenzimlerini hazırlanan kolonla ayırmak için diğer araştırmacılar tarafından kullanılan elüsyon çözeltileriyle, tarafımızdan uygun bulunan çözeltiler denendi. Bunların konsantrasyonları ve uygulanma şekilleri şöyle idi:

(i) pH=8.0 de 2.5×10^{-3} M asetazolamid çözeltisiyle konsantrasyon gradienti elüsyonu.

Burada, Gradient Mixer (GM)in karışma bölümüne pH sı 8.0 olan 0.1 M Tris-SO₄ çözeltisinden 50 ml., diğer bölümüne de yine aynı tamponda hazırlanmış 50 ml. 2.5×10^{-3} M asetazolamid konuldu. Bu çözelti kolondan alınan elüat hızında üstten akıtıldı. Elüsyon hızı 30-35 ml./saat ve herbir fraksiyon 4 ml. olarak ayarlandı. Fraksiyonlarda protein tayini, asetazolamid 280 nm. de absorbands verdiği için, Lowry metoduyla yapıldı. Bu bileşik çok kuvvetli bir inhibitör olduğu için aktiviteler belirlenemedi. Tüplerde ölçülen protein miktarı yine tüp sırasına göre grafiğe çizildi (Grafik 7).

(ii) pH=6.5 ta 1.5 M NaCl çözeltisiyle konsantrasyon gradienti elüsyonu.

Bu denemede, GM nin karışma bölümüne 75 ml. pH sı 6.5 olan Tris-SO₄ tamponu, diğerine de yine 75 ml. aynı tamponda hazırlanmış 1.5 M NaCl çözeltisi konuldu. Elüsyon 30-35 ml./saat hızla ve tüp başına 4 ml. olarak gerçekleştirilirken, fraksiyonların 280 nm. deki absorbandsları ve aktiviteleri belirlenip grafiğe çizildi (Grafik 8).

(iii) 0.05 M KSCN çözeltisiyle pH gradienti elüsyonu

Söz konusu elüsyon, GM nin karışma bölümüne 0.1 M Tris-SO₄ tamponunda (pH=10.0) 0.05 M KSCN, diğer bölümünede 0.01 N H₂SO₄ içinde 0.05 M KSCN çözeltilerden 75 er ml. konularak gerçekleştirildi. Karbonik anhidraz kolondan 18 ml./saat hızla ve 4 er ml. lik fraksiyonlar halinde elüe edildi. Tüplerde 280 nm. absorbandsları okundu ve aktiviteleriyle beraber grafikte gösterildi (Grafik 9).

(iv) HCAB nin 1 M NaCl ve HCAC nin 0.4 M NaN₃ ile elüsyonu

Burada, önce pH sı 7.5 olan 0.1 M Tris-SO₄ tamponunda 1 M NaCl çözeltisi, fraksiyonlar 280-nm. de absorbands vermeyinceye kadar geçirildi ve sonra pH sı 7.0 olan aynı tamponun 0.4 M NaN₃ çözeltisiyle kolonda kalan bütün enzim elüe edildi. Tüplerdeki absorbands ve aktivite sırayla grafikte gösterildi (Grafik 10).

(v) HCAB nin 0.4 M KI ve HCAC nin 0.2 M KSCN ile elüsyonu

Bu denemede önce, pH sı 8.0 olan 0.1 M Tris-SO₄ tamponunda 0.4 M KI ve pH sı 6.5 olan aynı tamponda, 0.2 M KSCN çözeltileri sırayla (iv) nolu elüsyondaki gibi kolondan geçirildi. Daha sonra tüplerde toplanan elüatların 280 nm. deki absorbandsları ve aktiviteleri belirlenerek grafiğe çizildi (Grafik 11).

HCAB ve HCAC nin tam ayrılabilirdiği kanısına varılan (ii), (iv) ve (v) nolu denemelerin tepe noktaları fraksiyonlarına poliakrilamid disk jel elektroforezi uygulandı ve bantlar belirlendi.

2.3.10. Sığır böbreğinden karbonik anhidrazın saflaştırılması

Erzurum Et Kombinasından sağlanan sığır böbreği, kesimden hemen sonra hayvandan çıkarılıp, soğuk % 0.9 luk NaCl çözeltisine konuldu. 1-2 saat içerisinde çalışılacağı için ayrıca CO₂ karında dondurulması gerekmedi. Böbrek, önce bıçakla küçük parçalara bölündü ve yarım saat kadar yine % 0.9 luk NaCl çözeltisinde tutuldu. Böylece, böbrek dokusunda kalması muhtemel kanın uzaklaşması sağlandı. Parçalanmış böbrek (yaklaşık 250 g.) 0.1 M Tris-SO₄ tamponu (pH=7.5) içerisinde homojenize edildi. Daha sonra homojenat, 30 ml. lik polietilen tüplere doldurulup, 1000 rpm. de 15 dak. santrifüjlendi ve çökelek atıldı. Üstteki sıvı ikinci kez yüksek devirli ve soğutmalı santrifüjde 10.000 rpm. hızla döndürüldü. Elde edilen berrak pembemsi renkteki çözeltiler bir gece süreyen destile suya karşı dializlendi. Yaklaşık 120 ml. gelen böbrek ekstraktinin hacmi, konsantre etme metoduyla 60 ml. ye düşürüldü ve pH sı katı Tris ilâvesiyle 9.0 a ayarlandı. 0.1 M Tris-SO₄ tamponunda (pH=9.0) dengelenmiş 100 ml. kadar afinite jeli enzim çözeltisiyle birleştirilerek 75 dak. süreyle karıştırıldı ve Buchner hunisinde süzüldü. 250 ml. tamponla yıkanan jel, yine 100 ml. tampon içerisinde 3x75 cm. lik kolona aktarıldı. 14 cm. yüksekliğindeki jelin üzerinde bulunan fazla tampon akıtıldı. Adsorbe edilen başka proteinlerin uzaklaştırılması için elüatlar 280 nm. de absorbans vermeyinceye kadar tamponun 0.2 M Na₂SO₄ çözeltisiyle yıkandı. CA ise, aynı tamponun 0.2 M KSCN çözeltisiyle (pH=7.0) elüe edildi. 280 nm. de absorbans veren fraksiyonlar birleştirilerek enzim miktarı belirlendi. Daha sonra, hazırlanan böbrek enzimi yine sığırın eritrosit enzimi ile beraberce elektroforeze tabi tutuldu. Jellerin fotoğrafları Şekil 7 de gösterildi.

2.3.10. Sığır eritrosit enziminden apo karbonik anhidraz elde edilmesi

Karbonik anhidraz enziminden apo enzimin hazırlanması, yapısında bulunan Zn⁺² iyonunun çelatlayıcı bir bileşik (chelating agent) tarafından kompleks oluşturularak uzaklaştırılması prensibine dayanmaktadır.

Bu deneyde, çelatlayıcı olarak piridin-2,6-dikarboksilik asit (dipikolinik asit) kullanılırken, Hunt ve arkadaşları tarafından modifiye edilen Kidani ve arkadaşlarının metodu uygulandı (80,81).

33.4 g. piridin-2,6-dikarboksilik asit ve 24.2 g. Tris alınarak 1.5 lt. didestile suda çözüldü ve pH 7.0 e kadar 1N H₂SO₄ ile titre edildikten sonra 2 lt. ye tamamlandı. Hazırlanan bu çözeltinin konsantrasyonu 0.1 M Tris-SO₄ ve 0.1 M piridin-2,6-dikarboksilik asit idi. Daha sonra pH sı 7.0 olan,

0.1 M Tris- SO_4 ın 10 ml. sinde 0.096 g. sığır CA sı çözüldü ve çelatlayıcı çözeltiye karşı iki saat süreyle dializ edildi.

Daha sonra, apo CA çözeltisi, deiyonize saf sudan hazırlanmış 0.1 M Tris- SO_4 (pH=9.0) tamponuna karşı, çözelti üç kez değiştirilerek, 10 saat süreyle dializlendi. Bu surette çelatlayıcı bileşik tamamen uzaklaştırılmış oldu.

Çelatlayıcıya karşı dializden önce ve çelatlayıcı uzaklaştırıldıktan sonra enzim çözeltisinden 0.2 ml. alınıp deiyonize saf su ile 20 ml. ye tamamlanarak, esteraz aktivitesi ve atomik absorpsiyon ile çinko tayini yapıldı. Çinko miktarının karşılaştırılmasıyla, aktif enzimin % 89 unun apo enzime dönüştürüldüğü bulundu.

Çelatlayıcıdan arındırılmış apo CA çözeltisi, daha önceden deiyonize saf su ile hazırlanan 0.1 M Tris- SO_4 (pH=9.0) tamponuyla dengelenmiş ve içinde 50 ml. jel bulunan afinite kolonuna aktarıldı. Kolon kapasitesi enzimin yaklaşık on misli kadar olduğu için, CA ın tamamı jel tarafından tutuldu. Adsorbe edilen apo CA, pH sı 7.5 olan ve yine deiyonize saf su ile hazırlanan 0.1 M Tris- SO_4 içinde 0.1 M NaCl çözeltisiyle elüe edildi. Elüatlarda esteraz aktivitesi ve çinko tayini yapıldı. Hiçbir aktivitenin olmadığı görülen çözeltide, çinko miktarı da ihmal edilebilecek düzeyde bulundu ve apo CA ın elüsyon grafiği çizildi (Grafik 12).

2.3.11. Apo karbonik anhidrazın çinko sülfat ile tekrar aktivasyonu

Bir önceki bölümde hazırlanan ve konsantre etme işlemiyle hacmı azaltılan apo CA çözeltisinden 10 ml. alındı. İçinde 21.3 mg. apo enzim bulunan çözelti (7.1×10^{-5} M), 1 er ml. halinde on ayrı tüpe bölündü. Hazırlanan 10^{-5} M lık ZnSO_4 çözeltisinden her bir tüpe 0.5 ml. arttırarak, yani, 1. tüpe 0.5 ml., 2. tüpe 1 ml., 3. tüpe 1.5 ml. v.b. şekilde ilave edildi ve deiyonize su ile 10 ml. ye tamamlandı. Her bir tüp için p-nitro fenil asetat ile esteraz aktivitesi tayini yapıldı ve aktivitelerde, ZnSO_4 ın artan oranlarına paralel olarak, bir artış gözlemlendi. Esteraz aktivitesi artan çinko konsantrasyonuna karşı grafikte gösterildi (Grafik 13).

3. DENEY SONUÇLARI

3.1. AFİNİTE JELİ

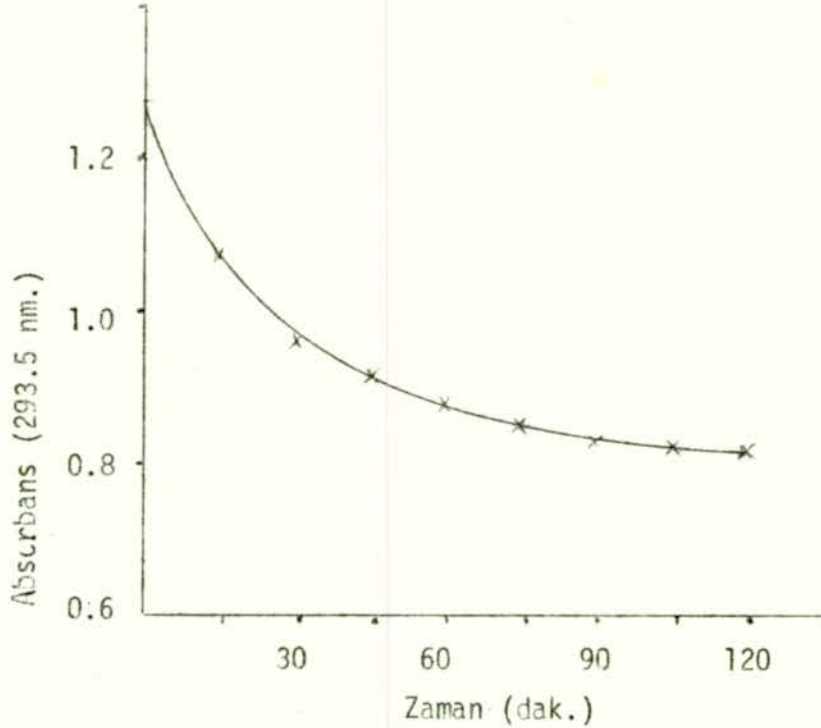
3.1.1. CM Sephadex'e bağlanan L-tirozin ve sulfanilamid miktarları

Metodlar bölümünde anlatılan prosedürle 4 ayrı jel hazırlandı. L-tirozinin aktiveleştirilen CM Sephadex'e bağlanma reaksiyonu hakkında, literatürde herhangi bir bilgiye rastlanmadığı için, bunun belirlenmesi gayesiyle tepkime kabından alınan örneklerin 293.5 nm. de absorbansları okundu ve grafiğe çizildi (Grafik 1). Grafikteki eğrinin zamanla değişiminden görüldüğü gibi 90. dakikadan sonra bağlanan L-tirozin miktarında önemli bir değişme olmamaktadır. Buna dayanarak, diğer jel sentezlerinde bu süre esas alındı.

Hazırlanan 4 ayrı jele bağlı L-tirozin miktarları spektrofotometrik yolla, sulfanilamid miktarları ise elementel analizle bulunan azot yüzdesinden hesaplanarak belirlendi. Bulunan değerler Tablo 2 de gösterildi. Herbir deney aynı şartlar ve reaktif oranlarıyla yapıldığı halde, birbirlerinden önemli derecede farklı miktarda L-tirozin ve sulfanilamid bağlandığı bu tablodan görülmektedir. Kenetlenen sulfanilamid ile L-tirozin seviyeleri arasında da bir korelasyona rastlanmamaktadır. 4 ayrı deneyle hazırlanan bu jellerden en çok sulfanilamid inhibitörü içeren 3.sü, CA kapasitesi tayinlerinde kullanıldı. Diğer jeller birleştirilerek izoenzimlerin saflaştırılma işlemlerinde denendi.

Tablo 2- 4 ayrı deneyle elde edilen afinite jellerine bağlı L-tirozin ve p-aminobenzen sulfonamid miktarları

Deney	Kuru jel miktarı(g.)	Bağlı L-tirozin (mmol/g.kuru jel)	%N	Bağlı Sulfanilamid (mmol/g.kuru jel)
1	1	1.99	2.49	0.159
2	2	1.72	2.39	0.193
3	2	1.83	2.53	0.215
4	1	1.69	2.31	0.174



Grafik 1- L-tirozinin aktifleştirilmiş CM Sephadex'e bağlanma miktarının zamanla değişimi.

3.1.2. Kolonun CA tutma kapasitesi

3.1.2.1. İnsan ve sığır karbonik anhidrazı

İnsan ve sığır karbonik anhidraz enzimlerinin hazırlanan afinite kolonu tarafından tutulma kapasiteleri Tablo 3'te verilmiştir. Tabloda ayrıca jele bağlı inhibitörün CA'ı bağlamasındaki yüzde verim de gösterilmiştir.

Sonuçlardan jelin BCA'ı en yüksek oranda bağladığı ve C izoenzimini B'ye göre daha yüksek düzeyde adsorbe ettiği anlaşılmaktadır. İnsan izoenzimleri karışımı (HCA) ise, B izoenziminden biraz daha fazla tutulmaktadır.

Tablo 3- Afinite jelinin insan ve sığır karbonik anhidrazlarını bağlama kapasiteleri.

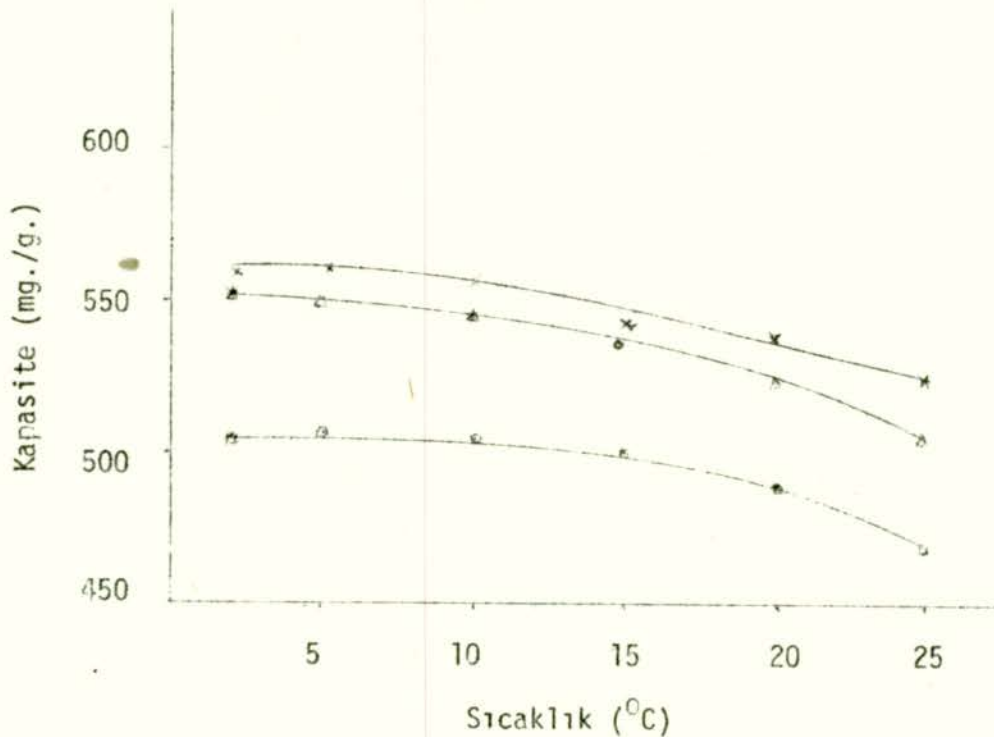
Enzim	Kapasite (mg.enzim/ g. kuru jel)	Jele bağlı sulfanilamid miktarı (mmol/g.kuru jel)	bağlanma yüzdesi (%)
HCA	516	0.215	8.0
HCAB	509	0.215	7.9
HCAC	554	0.215	8.6
BCA	567	0.215	8.8

3.1.2.2. Kolon kapasitesinin sıcaklığa bağımlılığı

Kolon kapasitelerinin sıcaklığa ne derece bağımlı olduklarını göstermek için, pH=9.0 da ve 6 ayrı sıcaklıkta insan ve sığır enzimleriyle yapılan deneylerin sonuçları Tablo 4 ve Grafik 2'de gösterilmiştir. Jelin CA'ı en çok tuttuğu 2° ve 5°C sıcaklıklardan sonra, bütün enzimlerin tutulma kapasitelerinde paralel bir düşme görülmektedir. Fakat bu düşüşün nisbeten az olduğu eğriden anlaşılmaktadır.

Tablo 4- HCAB, HCAC ve BCA enzimlerinin değişik sıcaklıklarda afinite jeli tarafından tutulma miktarları

Sıcaklık (°C)	Kapasite (mg. enzim/g. kuru jel)		
	HCAB	HCAC	BCA
2	509	554	567
5	510	550	571
10	502	541	558
15	502	535	541
20	485	523	545
25	470	518	525



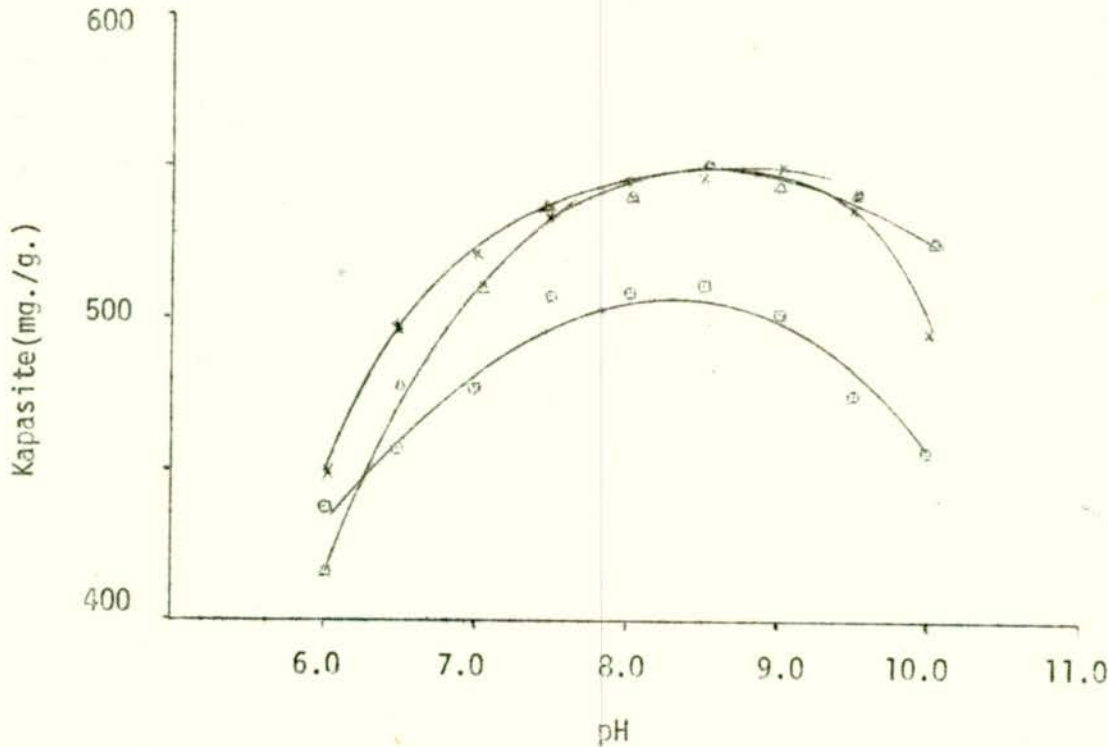
Grafik 2- Kolon kapasitesinin sıcaklıkla değişme eğrileri. (x) BCA, (o) HCAC ve (n) HCAB izoenzimlerini göstermektedir.

3.1.2.3. Kolon kapasitesinin pH'ya bağımlılığı

Bu deneyler yine insan ve sığır enzimleriyle, sabit iyonik şiddet-te ve pH'sı 6.0 ile 10.0 arasında değişen 9 ayrı ortamda yapılmış ve sonuç-lar Tablo 5 ve Grafik 3'te gösterilmiştir. Herbir enzim için, kapasitenin en yüksek olduğu ve düşmeye başladığı pH değerlerinin farklı oldukları gra-fikten görülmektedir.

Tablo 5- Afinite jelinin, farklı pH'larda HCAB, HCAC ve BCA tutma kapasiteleri.

pH	Kapasite(mg.enzim/g. kuru jel)		
	HCAB	HCAC	BCA
6.0	438	418	450
6.5	457	478	498
7.0	473	510	520
7.5	505	543	530
8.0	503	540	548
8.5	510	548	543
9.0	502	542	555
9.5	477	540	536
10.0	459	525	491



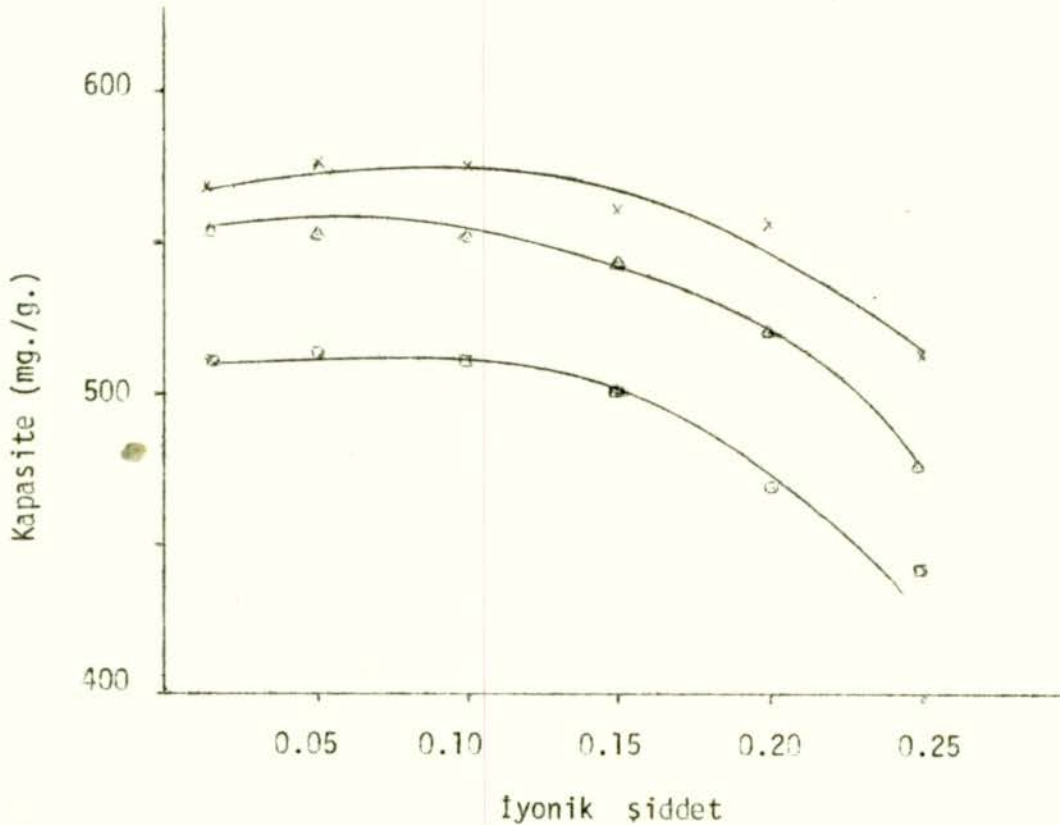
Grafik 3- Kolon kapasitesinin pH ile değişme eğrileri. (x) BCA, (Δ) HCAC ve (□) HCAB izoenzimlerini göstermektedir.

3.1.2.4. Kolon kapasitesinin iyonik şiddete bağımlılığı

Iyonik şiddetin etkisi de hem insan, hem de sığır enzimleri için incelenmişti. pH sı 9.0 olan 0.1 M Tris- SO_4 tamponunda gerçekleştirilen denemelerde iyonik şiddet 0.0165 ile 0.25 arasında 6 değer halinde ele alınmıştı. Elde edilen sonuçlar Tablo 6'da gösterildi ve değişimler Grafik 4'te çizildi. Tablo ve grafikten, herbir enzim için kapasitelerin birbirine paralel bir değişme gösterdikleri görülmektedir.

Tablo 6- HCAB, HCAC ve BCA enzimlerinin değişik iyon konsantrasyonlarında afinite jeli tarafından bağlanma kapasiteleri

İyonik şiddet	Kapasite(mg.enzim/g. kuru jel)		
	HCAB	HCAC	BCA
0.0165	509	554	567
0.0500	514	551	571
0.1000	510	546	575
0.1500	498	539	559
0.2000	469	518	554
0.2500	441	475	509



Grafik 4- Kolon kapasitesinin iyonik şiddetle değişme eğrileri.(x) BCA,(Δ) HCAC ve (○) HCAB izoenzimlerini göstermektedir.

3.2. İNSAN HEMOLİZATINDAN CA'ın DEAE SEPHADEX-A50 İLE KROMATOGRAFİSİ

Bu işlem, kapasite tayinlerinde kullanılmak üzere, hemoglobini uzaklaştırılmış, enzimce zengin çözeltiler hazırlamak amacıyla yapıldı. Hemolizattaki enzimin % 82 si daha az bir hacim ve ihmal edilebilir bir hemoglobin konsantrasyonuyla kolondan elde edildi. (250 ml. kandan, 135 ml. çözelti hacminde yaklaşık 0.35 g. ham enzim) Kromatografi işleminin elüsyon grafiği, fraksiyonlardaki 280 nm. dalga boyu absorbanları ve aktivitelerinin tüp sırasına göre çizilmesiyle elde edildi. Tüplerin sıralanması ilk absorban verenden başlamaktadır (Grafik 5).

İlk 12 fraksiyonun absorbanları 0.500 e kadar çıktığı halde, aktivitelerinin düşük olduğu grafikten görülmektedir. Bu çözeltilerin hafif pembe renkleri de, bir miktar hemoglobin içerdiklerini gösterdiklerinden, kullanılmadılar. 13 nolu tüpten 39. ya kadar fraksiyonlar birleştirildi. 48. tüpe kadarki fraksiyonlar da absorban ve aktiviteye sahip oldukları halde, çok düşük oranda enzim ihtiva ettiklerinden, enzim çözeltisinin hacmine arttırmamak için atıldılar.

Enzimce zengin çözeltinin disk jel elektroforezi bantları Şekil 3 te gösterilmiştir. Bu bantlardan okla işaret edilenlerin CA aktivitesine sahip oldukları jelin diğer yarısındaki denemelerden anlaşılmıştır.

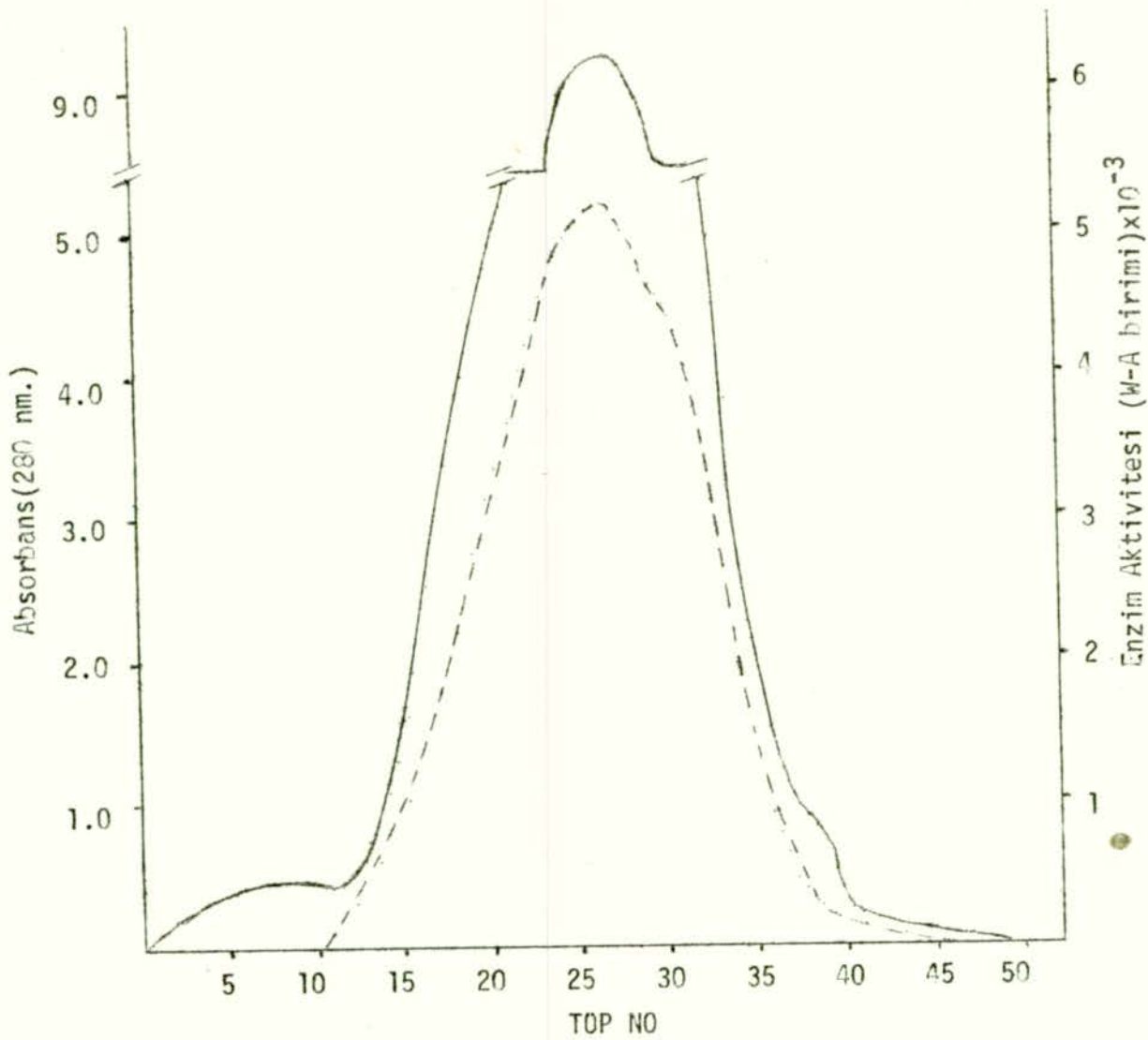
3.3. HEMOLİZATTAN HCA İZOENZİMLERİNİN AFİNİTE KROMATOGRAFİSİ

Hazırlanan afinite kolonu ile insan eritrosit karbonik anhidraz izoenzimlerinin ayrılması deneylerinde, değişik elüsyon çözeltileri kullanılmıştı. İzoenzim karışımları ise, kolona doğrudan doğruya hemolizattan bağlanmıştı. Bu bağlanma süresini tayin etmek için, hemolizattan 15 dak. aralıklarla 0.2 ml. örnek alınarak, su ile 10 ml. ye tamamlanmış ve bunun 0.2 ml., sinde Wilbur-Anderson metoduyla aktivite tayini yapılmıştı. Hemolizattaki CA aktivitesinin zamanla değişim eğrisi Grafik 6 da çizildi.

Eğride 75. dakikadan sonra önemli bir değişme görülmemektedir. Bu süre jelimizin hemolizat CA'ına doyma müddeti olarak kabul edildi ve diğer denemelerde 75 dakika sonunda jel hemolizattan süzüldü.

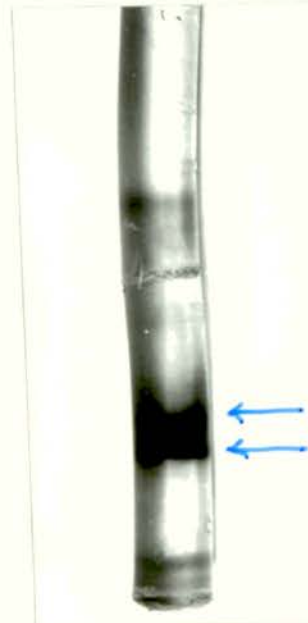
3.3.1. Asetazolamid elüsyonu

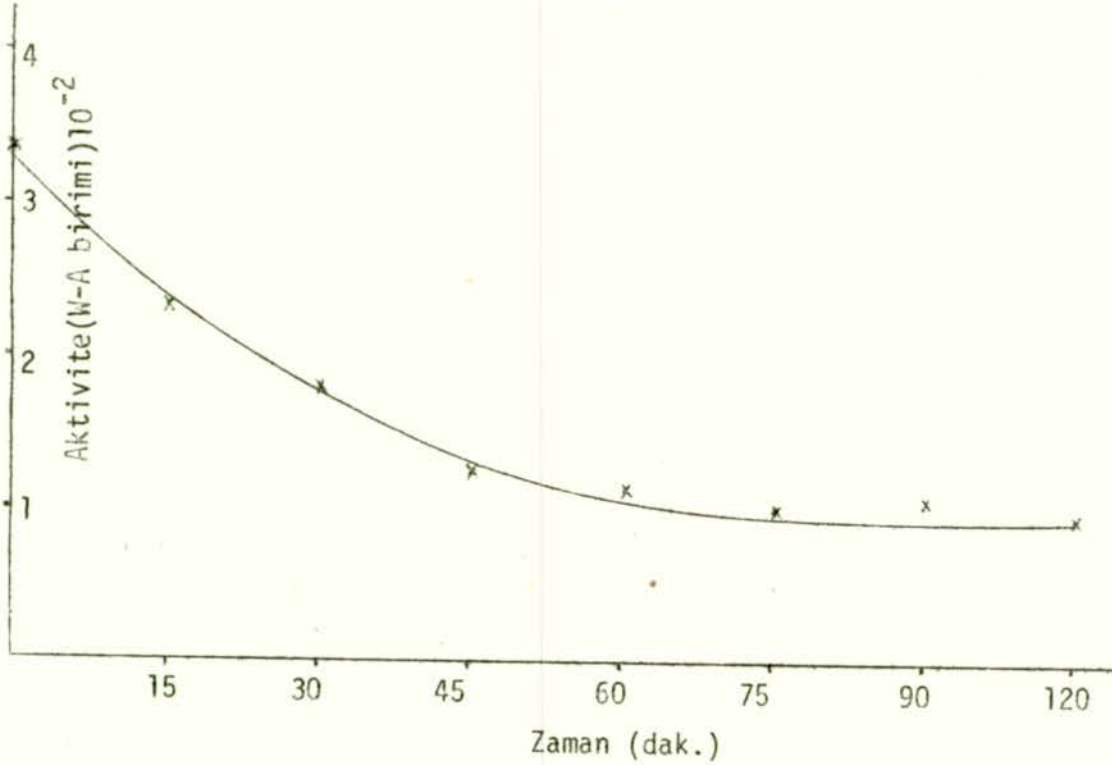
Asetazolamidin konsantrasyon gradienti ile yapılan elüsyonun eğrisi Grafik 7 de çizilmiştir. Grafik incelendiği zaman, izoenzimlerin birbirinden tam olarak ayrıldığı görülmektedir. Peaklerin yüksekliklerinden, önce HCAC



Grafik 5- HCA ın DEAE Sephadex-A50 kromatografisi. (—) 280 nm.deki optik dansite, (----) Wilbur-Anderson birimiyle enzim aktivitesi. Kolon 4x60 cm., jel yüksekliği 15 cm., elüsyon hızı 15 ml./saat ve fraksiyon hacmi 5 ml.

Şekil 3- DEAE Sephadex-A50 kromatografisi ile elde edilen çözeltinin elektroforez ile belirlenen protein bantları. Jel üzerinde okla gösterilen bantlar CA aktivitesine sahiptir.





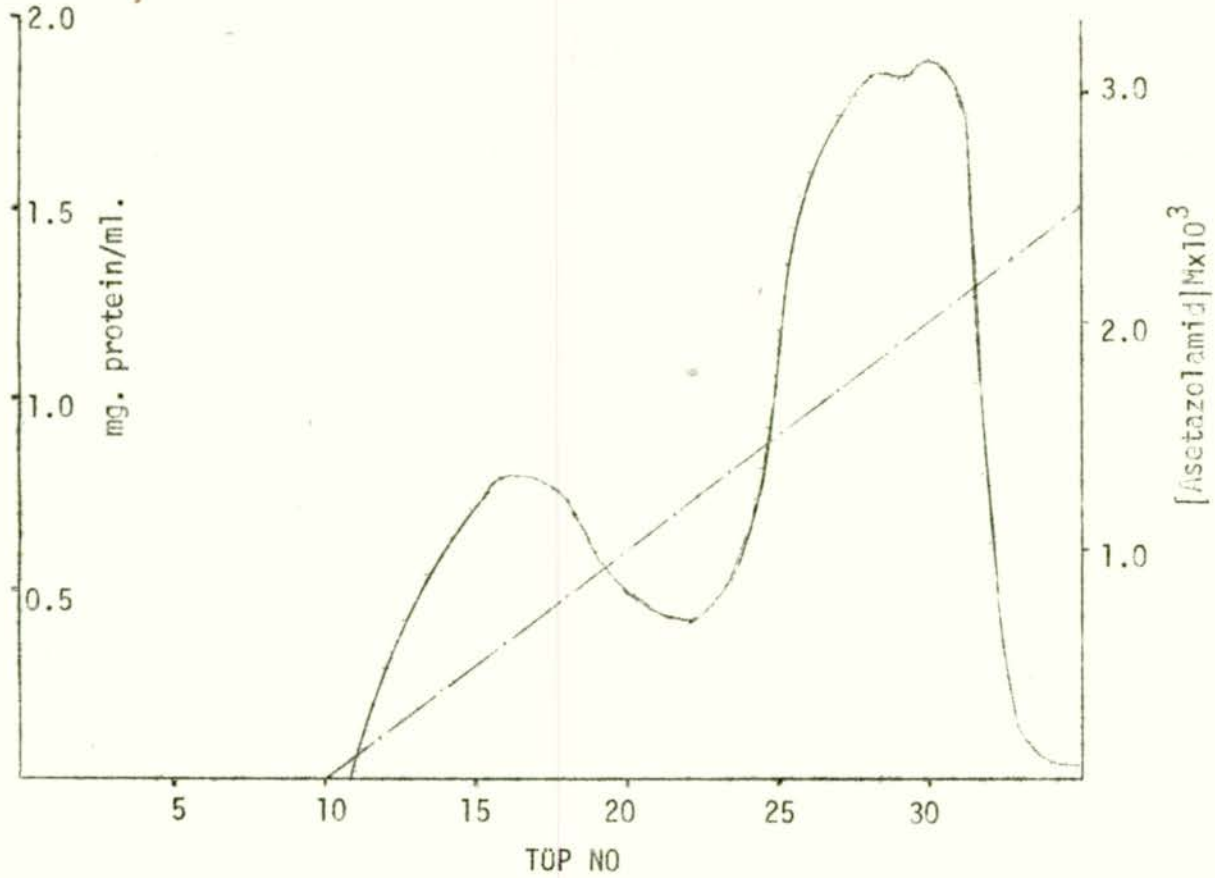
Grafik 6- Afinite jelinin hemolizat CA ını adsorbsiyon eğrisi.

nin çoğunlukta olduğu protein çözeltisinin, daha sonra da, HCAB nin çoğunlukta olduğu protein çözeltisinin kolondan aktığı anlaşılmaktadır. Bu denemede, aktiviteler kuvvetli inhibisyon yüzünden belirlenememiş ve protein miktarları Lowry metoduyla tayin edilmiştir.

3.3.2 Cl^- iyonu elüsyonu

pH=6.5 ta NaCl konsantrasyon gradienti ile yapılan bu deneyde, tüplerde toplanan fraksiyonların 280 nm. deki absorbansları ve aktiviteleri Grafik 8 de gösterilmiştir. Bu grafikten B ve C izoenzimlerinin elüsyonda, ayrı ayrı geldikleri görülmektedir. Yaklaşık 0.25 M Cl^- konsantrasyonunda elüatta görülmeye başlanan HCAB 24. fraksiyona kadar, daha sonra 1.25 M Cl^- konsantrasyonu civarında görülmeye başlanan HCAC, 28 ile 33 nolu tüpler arasında kolondan sırayla geldikleri anlaşılmaktadır. Aktivite eğrileri de ilk elüatlardaki enzimin düşük aktiviteli HCAB, ikinci olarak gelen izoenzimin ise yüksek aktiviteli HCAC olduğu kanısını vermektedir.

Ayrı ayrı birleştirilen izoenzimli fraksiyonların disk jel elektroforezi sonuçları Şekil 4 te verilmiştir. Herbir jelde, anoda doğru farklı yol almış tek bir bandın olması, izoenzimlerin tamamen ayrıldıklarını göstermektedir.



Grafik 7- Afinite kolonundan HCA izoenzimlerinin asetazolamid konsantrasyon gradienti ile elüsyonu. (—) protein miktarı, (---) asetazolamid konsantrasyonu, kolon 1.5x75 cm., jel yüksekliği 12 cm., elüsyon hızı 30-35 ml./saat ve fraksiyon hacmi 4 ml.

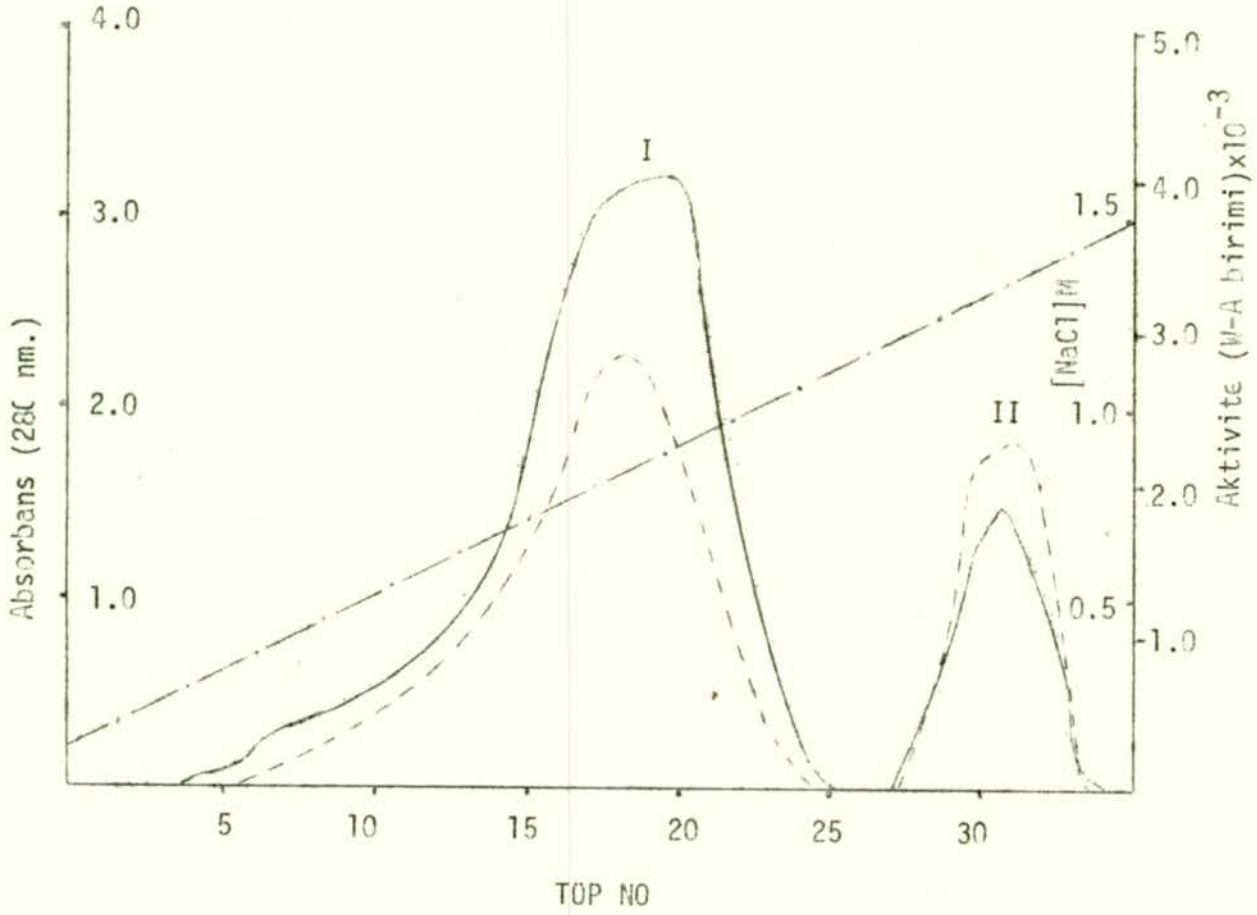
3.3.3. pH gradienti elüsyonu

Sabit 0.05 M KSCN konsantrasyonunda, 0.1 M Tris- SO_4 tamponunun, 0.01 N H_2SO_4 ile karıştırılması sonucu oluşturulan pH gradientinin kolona uygulanmasıyla elde edilen elüatların, 280 nm. deki absorbanları ve aktiviteleri Grafik 9 da gösterilmiştir. Yine grafikte gösterilen pH gradienti eğrisi Otomatik Titrasyon Cihazı vasıtasıyla bulunmuştur.

Burada, pH 8 civarında, enzim gelmeğe başlamaktadır. Fakat pH, 2 ye kadar düşürülmesine rağmen enzimlerin tamamen elüe edilemedikleri görülmektedir.

3.3.4. Izoenzimlerin Cl^- ve N_3^- iyonları ile elüsyonu

Bu denemede, HCAB, 1 M NaCl çözeltisi ile (pH=7.5), HCAC ise 0.4 M

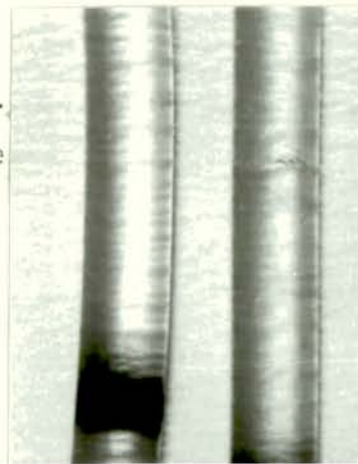


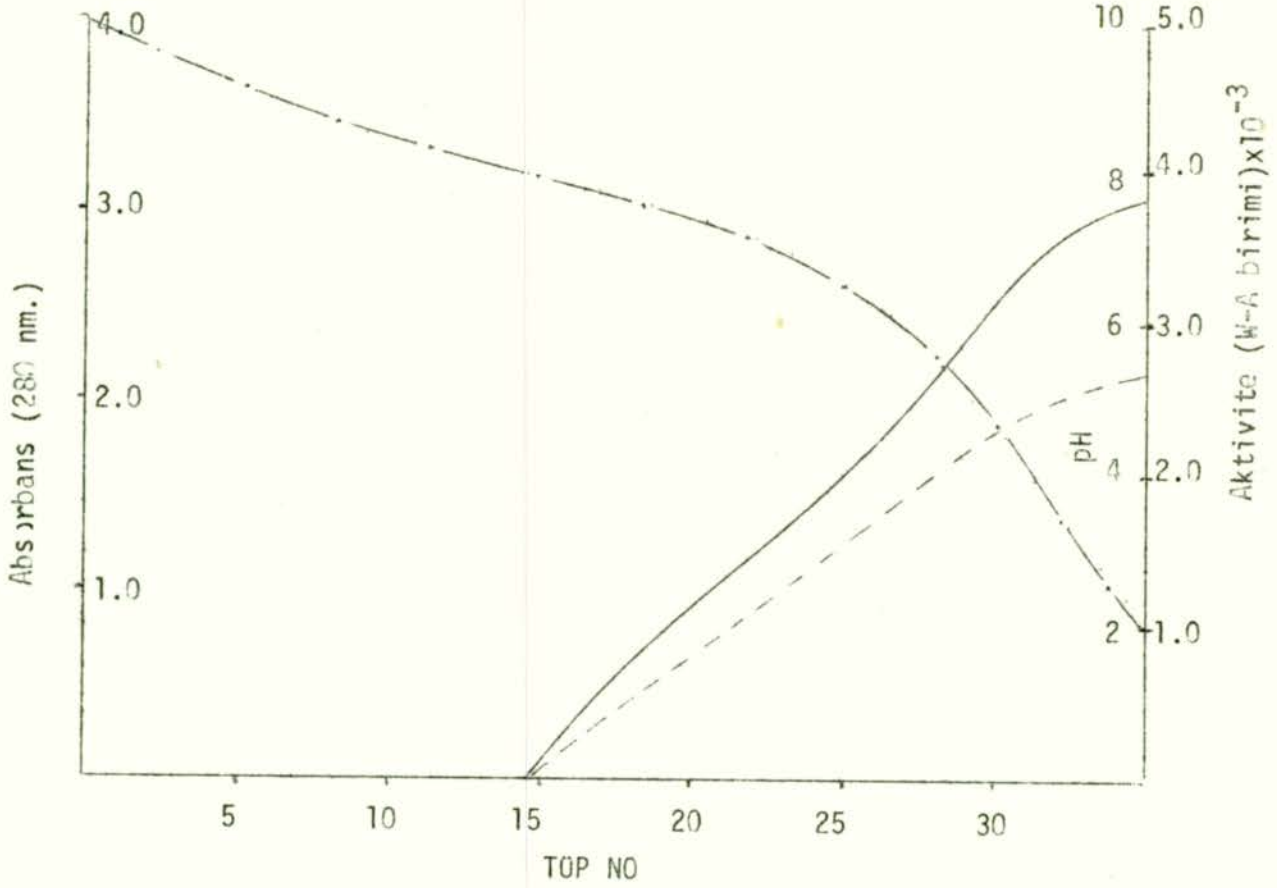
Grafik 8- Afinite kolonundan HCA izoenzimlerinin Cl^- iyonu konsantrasyon gradienti ile elüsyonu. (—) 280 nm. deki absorbans, (----) Wilbur-Anderson birimiyle aktivite, (— · —) NaCl konsantrasyonu, kolon 1.5x75 cm., jel yüksekliği 11.5 cm., elüsyon hızı 30-35 ml./saat ve fraksiyon hacmi 4 ml.

(i)

(ii)

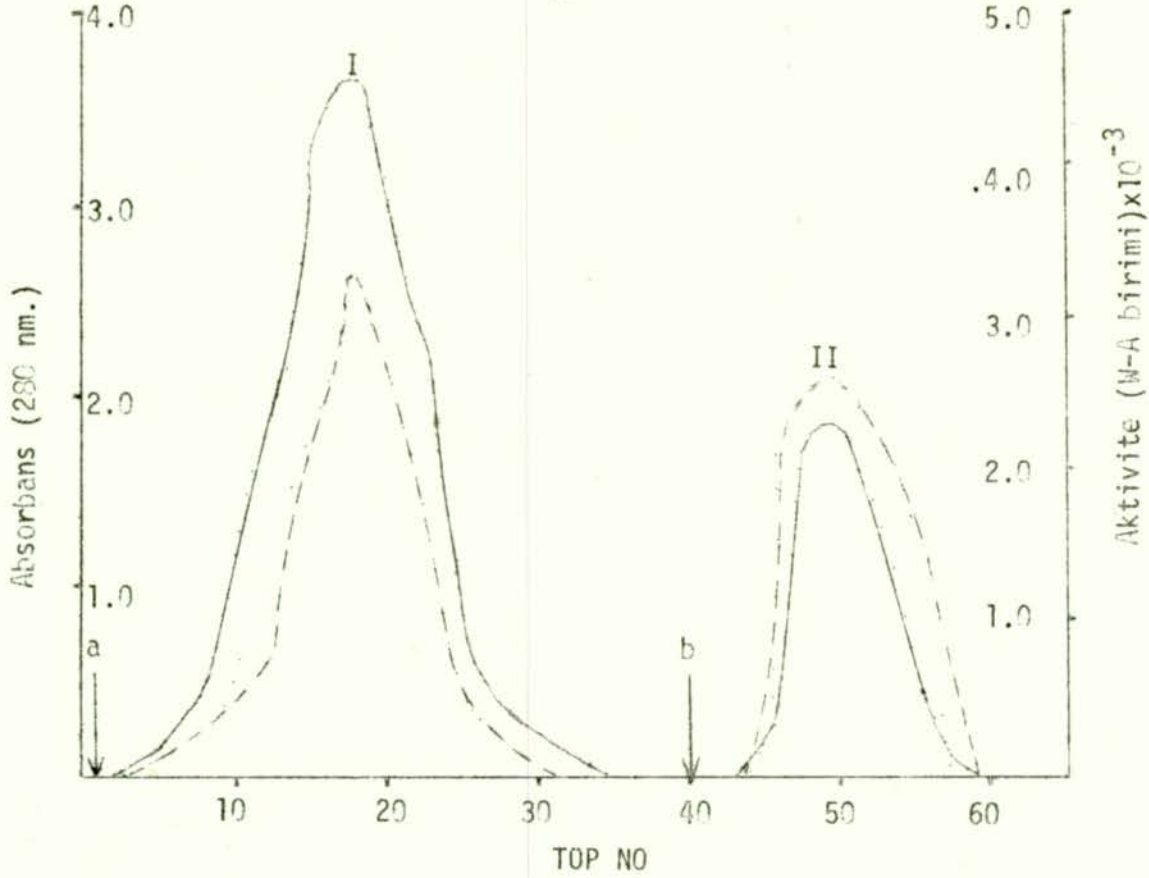
Şekil 4- Grafik 8 deki I ve II eğrileri altındaki enzim çözeltilerinin elektroforez bantları. (i) nolu jel HCAB, (ii) nolu jel ise HCAC ye aittir.





Grafik 9- Afinite kolonundan HCA izoenzimlerinin pH gradienti ile elüsyonu. (—) 280 nm. deki absorbans (----) Wilbur-Anderson birimiyle aktivite, (---) pH gradienti, kolon 1.5x75 cm., jel yüksekliği 12 cm., elüsyon hızı 18 ml./saat, fraksiyon hacmi 4 ml.

NaN₃ ile (pH=7.0) elüe edilmeye çalışılmıştır. Kolona önce NaCl çözeltisi, fraksiyonlarda protein görünmeyinceye kadar (yaklaşık 160 ml.) ve daha sonra NaN₃ çözeltisi (yaklaşık 75 ml.) uygulanmış ve elüatların absorbans ve aktiviteleri Grafik 10 da çizilmiştir. Bu grafikten HCAB ve HCAC izoenzimlerinin ayrı ayrı elüe edilebildiği görülmektedir. B izoenzimi 3 ile 34, C izoenzimi de 45 ile 58 nolu tüpler arasında gelmiş ve ayrı ayrı birleştirilmişlerdir. Bu çözeltilerin elektroforezi sonucu elde edilen bantlar Şekil 5 te gösterilmiştir. Jeller incelendiği zaman HCAC izoenzimi jelinin bir miktar HCAB bandı taşıdığı görülmektedir.

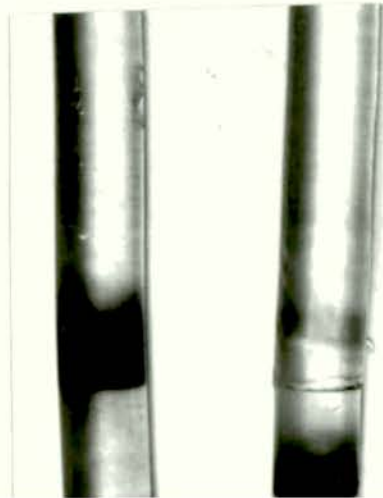


Grafik 10- Afinite kolonundan HCAB nin Cl^- , HCAC nin N_3^- çözeltileri ile elüsyonu. (—) 280 nm. deki absorbans, (----) Wilbur-Anderson birimiyle aktivite, kolon 1.5x75 cm., jel yüksekliği 11.0 cm., elüsyon hızı 30-35 ml./saat ve fraksiyon hacmi 4 ml. a ve b noktaları sırasıyla NaCl ve NaN_3 çözeltilerinin kolona uygulanma anıdır.

(i)

(ii)

Şekil 5- Grafik 10 daki I ve II eğrileri altındaki enzim çözeltilerinin disk jel elektroforezi bantları. (i) nolu jel HCAB, (ii) nolu jel ise HCAC ye aittir.



3.3.5. İzoenzimlerin I^- ve SCN^- iyonlarıyla elüsyonu

Burada, HCAB, pH=8.0 de 0.4 M KI ve HCAC ise pH=6.5 ta 0.2 M KSCN çözeltileri ile kolondan ayrı ayrı indirilmeye çalışılmıştır. Kromatografi işleminde , kolona önce KI, daha sonra KSCN çözeltileri uygulandıktan sonra alınan elüatların absorbands ve aktiviteleri, tüp sırasına göre, Grafik 11 de gösterilmiştir. Eğrilerden izoenzimlerin seçimli olarak elüe edildikleri anlaşılmaktadır. HCAB, 9 ile 66 nolu, HCAC de 77 ile 93 nolu fraksiyonlar arasında geldiğinden, bu çözeltiler ayrı ayrı birleştirilip, disk jel elektroforezi ile saflık kontrolü yapıldı. Şekil 6 da yer verilen jel fotoğraflarından izoenzimlerin birbirlerinden tam olarak ayrıldıkları anlaşılmaktadır.

3.4. SIĞIR BÖBREK KARBONİK ANHİDRAZININ AFİNİTE KROMATOĞRAFİSİ

Hazırladığımız afinite kolonunun dokulardan CA izolasyonunda ne derece yararlı olabileceğini denemek amacıyla, yaklaşık 250 g. sığır böbreğinin çözünebilir proteinleri homojenizasyonla ekstrakte edilmişti. Hacmi Sephadex-G 25 ile 50 ml. ye düşürülen ekstrakt, afinite jeliyle karıştırılarak , CA adsorbe edilmiş ve daha sonra kolondan alınmıştı. Yapılan kantitatif tayinle, 0.082 g. enzimin saflaştırıldığı görüldü.

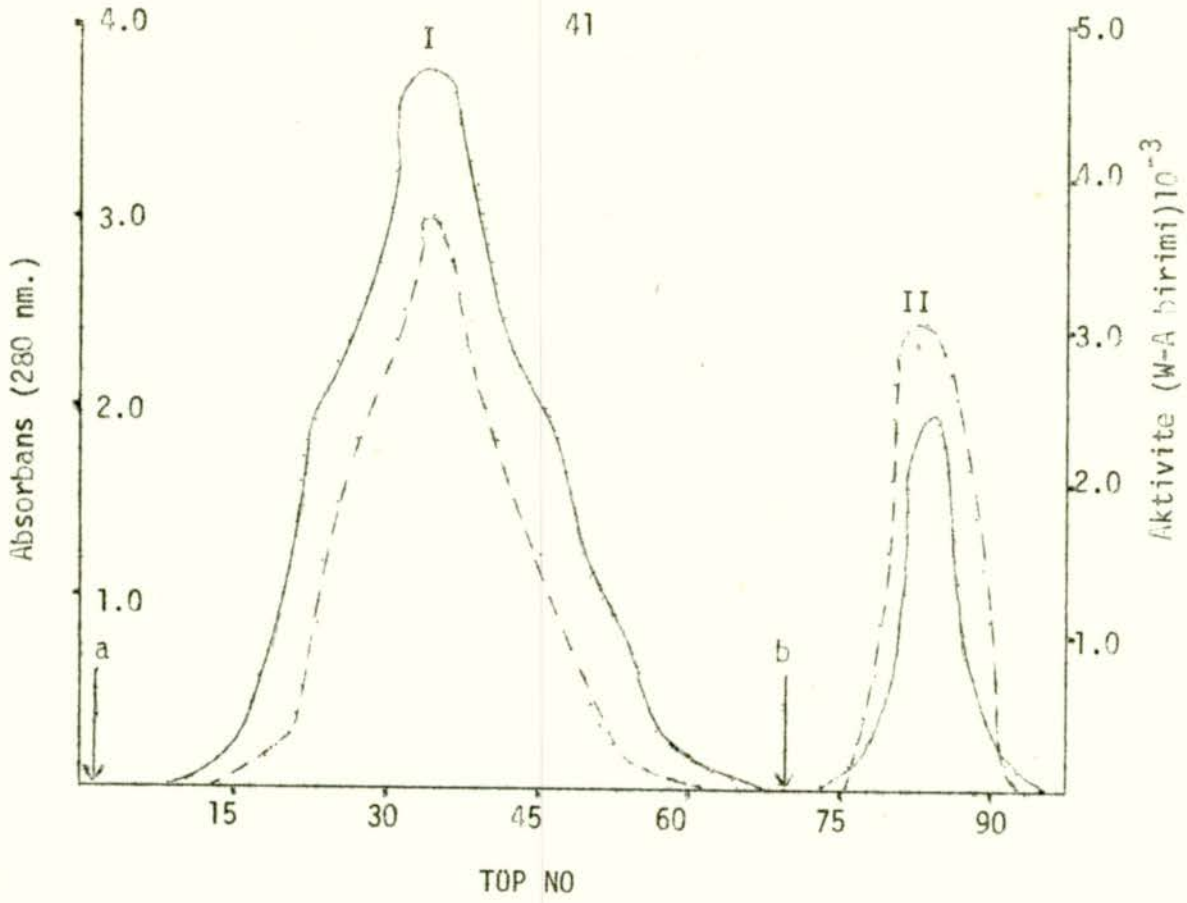
Önceden izole edilmiş sığır eritrosit enzimi ile böbrek enzimi beraberce disk jel elektroforezine tabi tutuldu. Elde edilen ve Şekil 7 de gösterilen jel fotoğraflarından, her iki enzime ait birer bandın anod yönüne aynı hızla yürümüş olduğu görülmektedir.

3.5. APO KARBONİK ANHİDRAZIN HAZIRLANMASI, AYRILMASI ve TEKRAR AKTİFLEŞTİRİLMESİ

Sığır eritrosit enziminden apo CA'nın hazırlanması ve daha sonra, bununla yapılan deneyler ile ilgili sonuçlar aşağıda, üç bölüm halinde verilmiştir.

3.5.1. Apo karbonik anhidrazın hazırlanması

Aktif CA'nın yapısında bulunan Zn^{+2} iyonu, 0.1 M piridin-2,6-dikarboksilik asit çözeltisine karşı enzimin diyalizlenmesiyle uzaklaştırılmış ve (i) başlangıçtaki, (ii) diyalizden ve (iii) afinite kromatografisinden sonra enzim çözeltilerinde aktivite ve atomik absorpsiyon ile Zn tayinleri yapılmıştır. Bunların sonuçları Tablo 7 da verilmiştir.

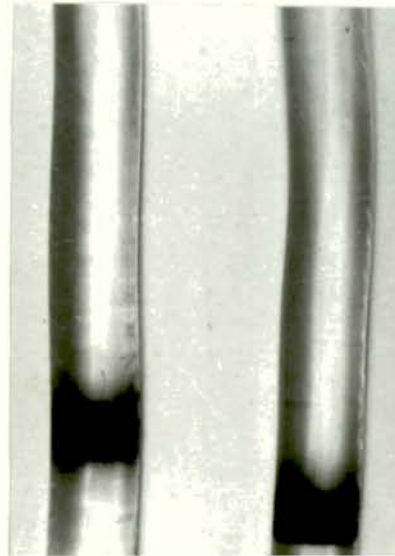


Grafik 11- Afinite kolonundan HCAB nin I^- ve HCAC nin SCN^- ile elüsyonu. (—) 280 nm. deki absorbans, (----) Wilbur-Anderson birimiyle aktivite, kolon 1.5x75 cm., jel yüksekliği 12 cm., elüsyon hızı 30-35 ml./saat ve fraksiyon hacmi 4 ml. a ve b noktaları ise, sırasıyla, KI ve KSCN çözeltilerinin kolona uygulanma anıdır.

(i)

(ii)

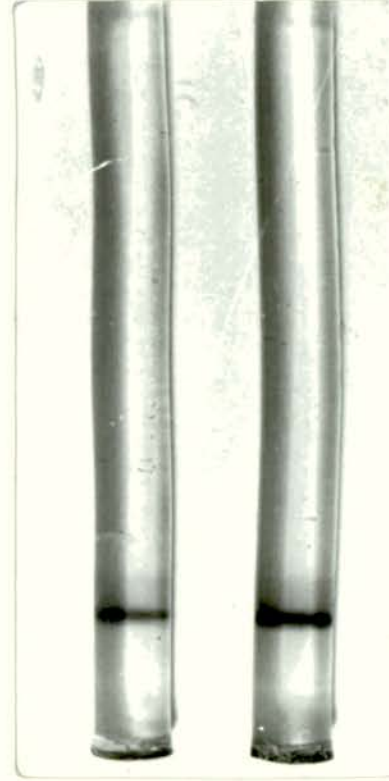
Şekil 6- Grafik 11 deki I ve II eğrileri altındaki enzim çözeltilerinin elektroforez bantları. (i) nolu jel HCAB, (ii) nolu jel ise HCAC'ye aittir.



(i)

(ii)

Şekil 7- Sığır böbrek ve eritrosit CA'larının paralel elektroforezi. (i) nolu jel böbrek, (ii) nolu jel ise eritrosit enzimlerine aittir.



Tablo 7- Apo CA'ın hazırlanması sırasındaki enzim çözeltilerinin aktivite ve çinko miktarları.

Çözelti ^x	Enzim miktarı g./lt.	mol/lt.	Zn miktarı mol/lt.	Dağılı aktivite
(i)	0.096	3.2×10^{-6}	3.27×10^{-6}	10
(ii)	0.096	3.2×10^{-6}	0.36×10^{-6}	1
(iii)	0.079	2.6×10^{-6}	önemsiz	0

^xÇözeltiler metinde geçen sırayla alınmıştır.

Tablodan görüldüğü gibi, diyaliz yoluyla enzim yapısında bulunan Zn^{+2} nin % 89 u uzaklaştırılmıştır. Başlangıç çözeltisindeki enzim mol sayısı ile çinko mol sayısı arasında görülen 0.07 mmollük fark, her iki ölçümün ayrı ayrı

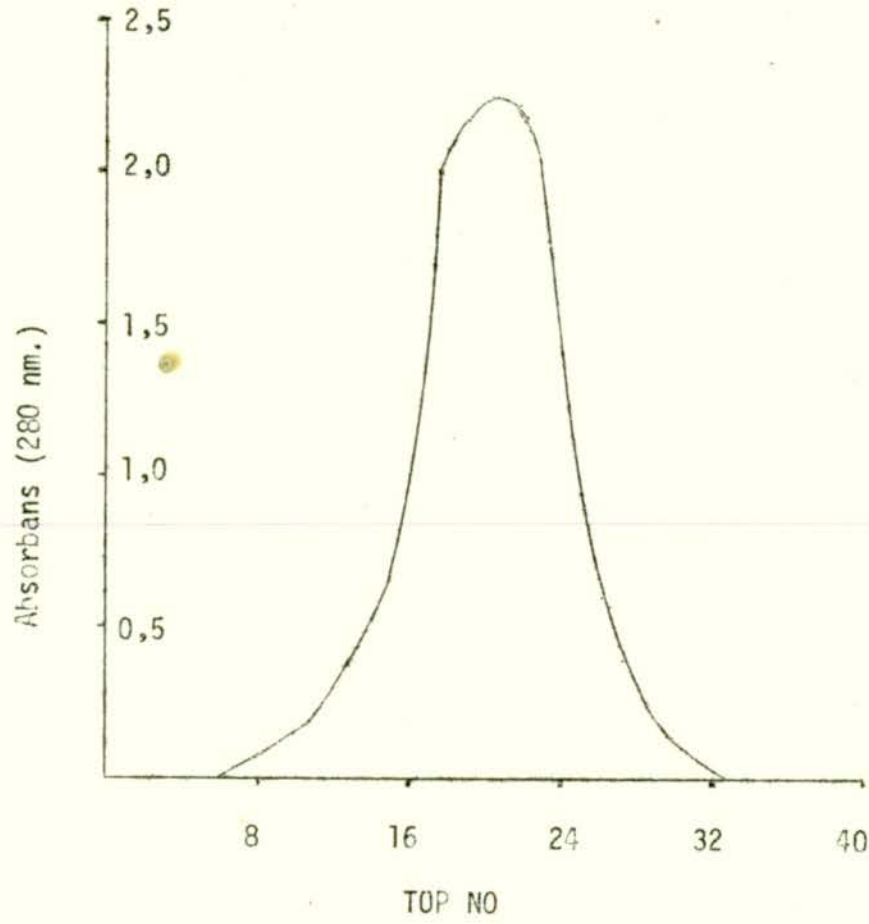
cihazlarda yapılmasından kaynaklanmaktadır.

3.5.2. Apo karbonik anhidrazın afinite kromatografisi

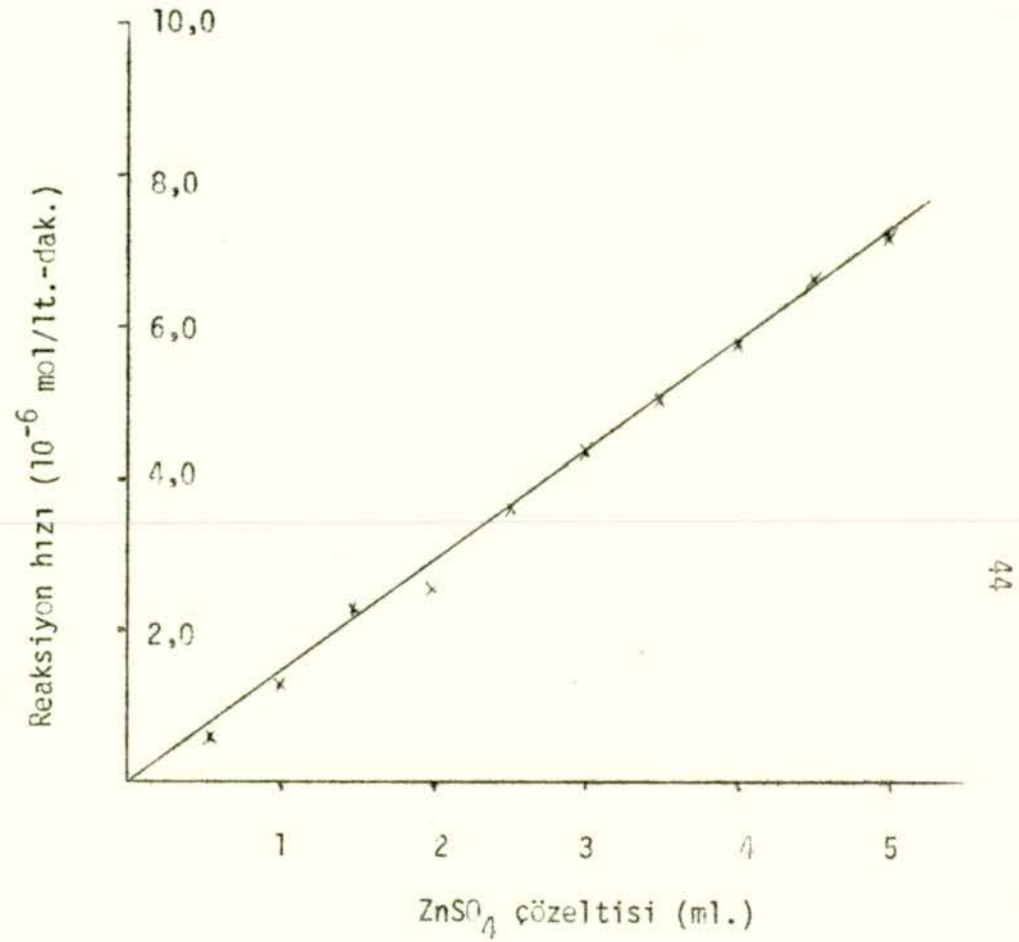
% 89 verimle oluşturulan apo CA çözeltisi, on kez daha fazla enzim bağlama kapasitesine sahip bir kolona uygulanmış ve pH 7.5 ta 0.1 M NaCl çözeltisi ile elüasyon gerçekleştirilmiştir. Hiç aktivite vermeyen elüatların tüp sırasına göre 280 nm. deki absorbanları Grafik 12 de gösterilmiştir.

3.5.3. Apo karbonik anhidrazın $ZnSO_4$ ile tekrar aktifleştirilmesi

Bu deneme, apo CA çözeltilerine artan stokiyometrik oranlarda $ZnSO_4$ ilâvesiyle, tekrar kazanılan esteraz aktivitesinin ölçülmesiyle gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon hızının eklenen 10^{-5} M $ZnSO_4$ ın hacmiyle değişimi Grafik 13 te gösterilmiştir. Burada, fazla bir sapma olmaksızın, bir doğru elde edilmiştir. Bu sonuç apo CA'ın reaktivasyon derecesinin, ilave edilen veya ortamda bulunan Zn^{+2} iyonunun stokiyometrik miktarıyla doğru orantılı olduğunu ortaya koymaktadır.



Grafik 12- Apo CA ın afinite kolonundan elüsyon grafiği. Kolon 1.5x75, jel yüksekliği 28 cm., elüsyon hızı 18 ml./saat, fraksiyon hacmi 4 ml.



Grafik 13- Apo CA ın tekrar aktivasyon derecesinin çinko miktarı ile değişimi. Kullanılan enzim ve ZnSO₄ konsantrasyonları sırayla 7.1×10^{-5} ve 1×10^{-5} M, Substrat 3 mM p-nitrofenil asetat, tampon 0.05 M Tris-SO₄ pH=7.5

4. T A R T I Ş M A

Bu çalışmada, karbonik anhidraz enziminin afinite kromatografisinde kullanılmak üzere, daha önceki araştırmacıların sentezlediklerinden farklı yapıda bir afinite jeli hazırlanmıştır. Jelin sentezlenmesinde kullanılan reaksiyonlar ve jele takılan uzantı kolunun farklı bir kimyasal yapı ve uzunluğa sahip olması, metodumuzun en önemli özelliklerinden birisidir. Hazırlanan jelin karbonik anhidraz bağlama kapasitesinin yüksek ve akış özelliklerinin sentez sırasında değişmemiş bulunması, başta belirtilmiş olan amacımızın gerçekleştiğini göstermektedir.

Bu bölümün ilerideki kısımlarında, çalışmamız esnasında kullanılan metodlar ve elde edilen sonuçlar sırayla ele alınarak tartışılacaktır.

Denemelerimiz boyunca, kromatografi işlemlerinde elde edilen kolon elüatlarının protein ihtiva edip etmedikleri, 280 nm. deki absorpsiyonlarıyla belirlendi. Bu yolla yapılan kalitatif tayin, proteinin yapısında bulunan tirozin ve triptofanın, bu dalga boyunda, maksimum absorpsiyon vermesi prensibine dayanmaktadır (71). Eğer bir protein zincirindeki tirozin ve triptofan amino asitlerinin sayısı biliniyorsa, o proteinin, 280 nm. deki absorpsiyonundan, miktarı da bulunabilir. Fakat bu protein çözeltide saf halde olmalıdır. Amino asit oranları bilinen proteinlerin, bu dalga boyunda ve 1 cm. ışık yolunda yaptıkları absorpsiyon, ekstinksiyon katsayıları halinde verilir. Bu ya molar ekstinksiyon katsayısı ($\epsilon_{280 \text{ nm.}}$), ya da $A_1^{1\%}$ olarak belirtilir. $A_1^{1\%}$, 1 g. proteinin 100 ml. çözeltisindeki 1 cm. ışık yolunda absorpsiyonudur. Deneylerimizde, üzerinde çalıştığımız insan karbonik anhidraz izoenzimleri B ve C ve sığır enzimi için $A_1^{1\%}$, sırayla, 16.3, 18.7 ve 19.0 olduğundan, saf enzim çözeltilerinde bu ekstinksiyon katsayıları kullanıldı ve enzim miktarları tayin edildi (73). Protein karışımı çözeltilerinde ve 280 nm. de absorpsiyon veren yabancı bileşikler taşıyan kolon elüatlarında, kantitatif protein tayini Lowry metoduyla yapıldı (72). Daha önceden laboratuvarımızda bu metodun standart protein eğrileri çizilmiş olduğundan, 750 nm. de elde edilen absorpsiyonlar, bu eğrilerle karşılaştırılarak, çözeltilerdeki protein miktarı bulundu.

Karbonik anhidraz enziminin aktivitesi iki ayrı yöntemle tayin edildi. Birincisi, enzimin CO_2 hidrataz aktivitesinin Rickli ve arkadaşları tarafından modifiye edilen Wilbur-Anderson metoduyla, ikincisi ise, esteraz aktivitesinin, p-nitro fenil asetatın hidrolizi prensibine dayanan, Armstrong ve arkadaşlarının yöntemiyle belirlenmesiydi. Wilbur-Anderson metodunda, CO_2 nin H_2O ile reaksiyonu sonucu oluşan H_2CO_3 in H^+ ve HCO_3^- iyonlarına ayrışarak ,

ortamın pH sını değiştirme süresi ölçülmektedir. Bu yöntem, " Giriş" bölümünde de belirtildiği gibi, enzimin CO_2 hidrataz aktivitesi sabitlerinin tayininde yararlı olamamaktadır. Çünkü reaksiyon süresince pH değişmekte ve aynı enzim tarafından dehidratasyonu katalize edilen HCO_3^- oluşmaktadır. Fakat çalışmamız esnasında, enzimin kinetik özellikleriyle ilgili deneyler yapıldığı ve yalnız elüatlardaki bağıl aktivite artış ve azalışları belirlendiği için, Wilbur-Anderson metodu uygulandı. Literatürde geçen bu tip çalışmalarda da genellikle bu yöntemin kullanılmış olması, seçimimizi doğrulamaktadır(12, 17,18,19,21,22,23,28,29,32,33,34,35,53,65,67,68,70).

p-nitro fenil asetatın hidrolizi ile ölçülen esteraz aktivitesi, apo karbonik anhidrazın çinko sülfatla tekrar aktive edilme derecesini belirlemede kullanıldı. Burada aktivitenin bağıl artışı tayin edilmişti. Bu iş için, Armstrong ve arkadaşlarının yönteminin tercih edilmesinin sebebi, Wilbur-Anderson metoduna nisbeten daha duyarlı olmasıdır. p-nitro fenil asetat esterini suda çözünmediği için, önce asetonda çözüldükten sonra sulu çözelti-leri hazırlandı. Aseton hidroliz reaksiyonunu en az inhibe eden organik çözücü olduğu için seçildi. p-nitro fenil asetatın hidrolizi reaksiyonu için bildirilen dietil malonik asit tamponu yerine Tris tamponu uygulandı. Dietil malonik asit tamponunda, esterin enzimsiz olarak çok az hidrolizlendiği belirtilmişse de, ölçümlerde kendi kendine hidroliz olan ester miktarı için gerekli düzeltme yapıldığından, bu sakınca ortadan kaldırılmış oldu. Kaldı ki daha önceden yapılmış bir çalışmada da bu maksatla Tris tamponunun kullanıldığı bildirilmektedir(88).

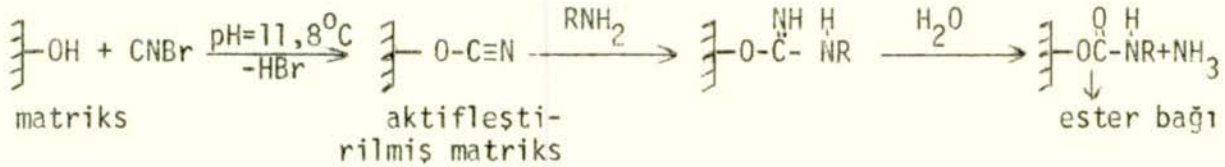
İzole edilen enzimlerin saflık kontrolü, disk jel elektroforezi ile gerçekleştirildi. Dayles'in metodu uygulanarak yapılan elektroforez deneylerinde, farklı olarak "spacer" jel adı verilen ve örneğin uygulandığı kısım yerine, numune, % 5 lik sukroz çözeltisi içinde tüplere konuldu. İşlemleri kolaylaştıran bu yol başka araştırmacılar tarafından da uygulanmıştır(23, 26,53). Elektroforez işlemi pH 9.0 da gerçekleştirildiği için proteinler anoda doğru taşınmış ve protein bantları Amido Black ile boyanarak, elde edilmiştir.

Afinite kromatografisinde kullanılan jel, üç ayrı reaksiyon sonucu sentezlendi. Önce, matriks olarak seçilen CM Sephadex-C50, EEDQ ile aktiveleştirildi ve buna amid bağıyla L-tirozin bağlandıktan sonra diazolanmış p-amino benzen sulfonamid kenetlendi.

Serbest karboksil grubu taşıyan matriksin aktiveleştirilmesinde kullanılan EEDQ dan ilk kez, 1974 yılında, enzim immobilizasyonunda yararlanılmıştır (75,89). EEDQ in karboksil grubuyla reaksiyonu sonucu, yüksek pH ve sı-

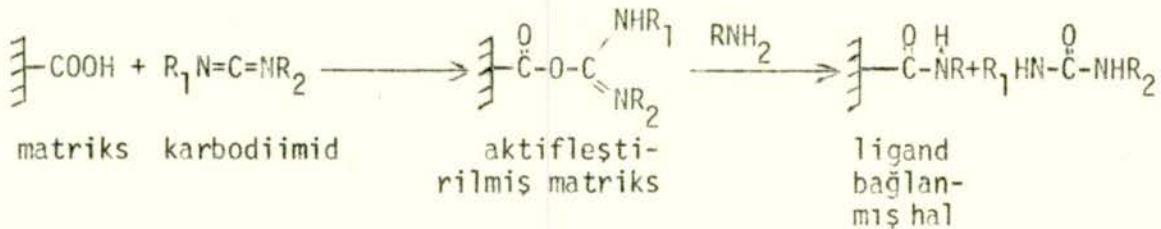
caklıkta, oldukça kararsız bir karışık karbonik anhidrit yapısı oluşmaktadır. Bu ise primer amin gruplarıyla hemen reaksiyona girerken, bir amid bağı meydana getirir. Afinite jelinin sentezlenmesinde, matriksin aktifleştirilmesi başka araştırmacılar tarafından siyano bromür, karbodiimid ve epoksi bileşikler kullanılarak yapılmıştır.

Siyano bromür (CNBr), matriks olarak kullanılan, dekstran ve agaroz yapısında Sephadex, Sepharose veya Bio-Gel'in içerdikleri -OH gruplarını aktifleştirmekte ve bunlar primer amino grubuna sahip olan bileşiklerle reaksiyona girerek, sonuçta bir ester bağı oluşturmaktadır (55,56,57). Bu bileşikle gerçekleştirilen aktifleştirme ve bağlanma reaksiyonları şöyledir:



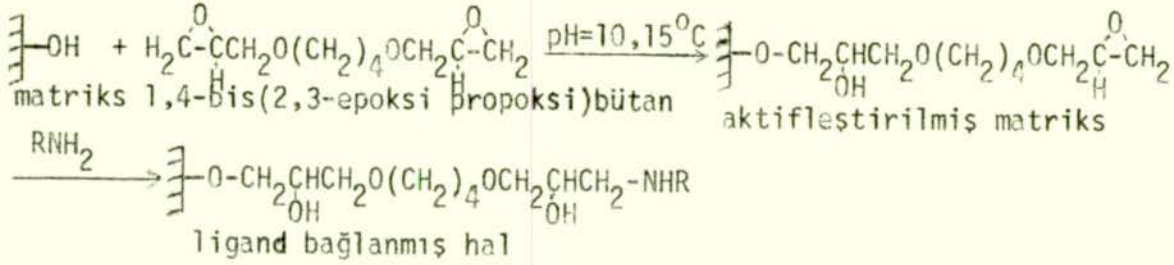
CNBr aktifleştirmesi ile hazırlanan jeller, karbonik anhidrazın afinite kromatografisinde kullanıldığında, zamanla adsorbsiyon özelliklerini kaybetmektedir. Çünkü, karbonik anhidraz enzimi, özellikle pH 8.0 in üzerinde, yüksek esterase aktivitesine sahiptir. Bundan dolayı kromatografi esnasında, ligandın matrikse bağlı olduğu ester bağı parçalamaktadır.

Karbodiimid bileşikler, serbest karboksil grubuna sahip olan matrikslerin aktifleştirilmesinde kullanılmaktadır. Aktifleştirme ve primer aminlere bağlanma reaksiyonları şöyledir:



Karbodiimid ile aktifleştirilmiş matrikse primer amin grubunun bağlanmasıyla, amid bağı oluşmaktadır. Bu bağ kromatografi işlemlerine dayanıklıdır. Fakat, aktifleştirme esnasında matriks jeli, pH=4.5 ta, 24 saat süreyle karıştırılmaktadır. Bu işlem, jelin kromatografi sırasındaki akış özelliklerini olumsuz yönde etkilemektedir.

Matriksin epoksi bileşiklerle aktifleştirilmesi (oksiran aktifleştirme) de, Sephadex ve Sepharose yapılarındaki -OH grupları üzerinden olmaktadır. Reaksiyonlar 1,4-bis(2,3-epoksi propoksi) butan epoksi bileşiği için şöyledir:



Yukarıdaki reaksiyonlarla, primer amino grubu ihtiva eden ligand, polar yapıda bir uzantı kolunun ardından, matrikse kovalant olarak bağlanmaktadır (58,68,69). Kromatografi işlemlerine gayet dayanıklı olan bu yapı, 16 saat aktiveleştirme ve 16 saat te ligandın bağlanma süresi sonucu oluşmaktadır. pH'nın 10 civarında olması, jelin fiziksel yapısını fazla etkilememesine rağmen, uzun süre (yaklaşık 30 saat) karıştırma işlemleri polisakkarit partiküllerin şekil bakımından deformasyonuna sebep olabilir. Sonuç olarak hazırlanacak afinite jelinin akış özellikleri olumsuz yönde etkilenecektir.

Çalışmamız esnasında, EEDQ reaktifi kullanmakla, hem aktiveleştirme, hem de ligandın bağlanması 5 saat içinde gerçekleştirildi. Bu surette, CM Sephadex jelinin akış özelliklerinin fazla etkilenmemesi sağlandı. Bunun yanı sıra, matrikse olan kovalant bağlanmanın bir amid bağıyla sonuçlanması, karbonik anhidrazın afinite kromatografisinde ester bağının sakıncalarını da ortadan kaldırmış oldu.

Çalışmamızda, 1 g. CM Sephadex'in aktiveleştirilmesi için 1.5 g. EEDQ harcandı. Sundaram uyguladığı metotta 1 g. kuru jelle 0.6 ile 1.0 g. arasında EEDQ kullanmıştır (75). Deneylerimizde bu reaktif daha yüksek oranda (1.5 g.) katıldığından, aktiveleşme derecesinin EEDQ miktarıyla değişimini incelemeye gerek duyulmadı. Reaksiyon ortamı pH'sı 4 te sabit tutulmuştu. Daha önceden anlatıldığı gibi, oluşan aktif anhidrit yapı, yüksek pH'larda bozunmakta, düşük pH'larda da EEDQ, kinoline dönüşmektedir. Sundaram ve Telefoncu tarafından pH=4, en verimli aktiveleştirme ortamı olarak belirlendiğinden, deneylerimiz de bu pH'da gerçekleştirildi.

Öretici firma tarafından belirtildiği gibi, 1 g. kuru CM Sephadex yapısında 4.5 ± 0.5 mmol serbest karboksil grubu içermektedir. Bu grupların tamamının aktiveleştirildiği varsayılarak, yaklaşık 5,5 mmol (1.0 g.) L-tirozin kullanıldı. Bu miktar aktiveleşme oranının çok üzerinde bir değer olduğundan L-tirozinin de değişik miktarlarda denenmesine gerek duyulmadı.

Kenetlemek için diazolama reaksiyonunda 0.350 g. sulfanilamid kulla-

nıldı. Tablo 2 deki kenetlenen inhibitör değerleri gözönüne alındığında, bu miktarın jele takılandan 10 misli fazla olduğu görülmektedir. Bu ise, reaksiyona sokulan sulfanilamidin, kenetlenme oranını sınırlamayacak kadar yüksek düzeyde olduğunu göstermektedir. Diazolama işleminde, NaNO_2 ve HCl in sulfanilamide oranları, Cuatrecasas'ın tavsiye ettiği kadar alındı (56). Burada, $100\mu\text{mol}$ ligand için 1.5 N HCl den 1.5 ml. ve $700\mu\text{mol NaNO}_2$ öngörülmektedir.

DeneySEL Bölümde anlatılan metodu uygulayarak, aynı reaktif oranları ve aynı şartlarda sentezlenen 4 ayrı afinite jeline bağlı L-tirozin ve sulfanilamid miktarları Tablo 2 de gösterilmiştir. Toplam 6 g. kuru jelin afinite kromatografisi için hazırlandığı deney sonuçlarından, CM Sephadex üzerindeki serbest karboksil gruplarının, % 38-43 arasında bir verimle aktifleştirildiği, takılan L-tirozin miktarlarından görülmektedir. L-tirozin, en az pH 9.5 civarında çözündüğü için, bağlanma bu pH da gerçekleştirildi. Aktifleştirme sonucu oluşan karışık karbonik anhidrit yapı, yüksek pH larda ve sıcaklıklarda kararsız olup, primer aminlerle hemen reaksiyona gireceğinden, bağlanma reaksiyonu 90 dakikada tamamlandı. Anhidrit yapının, L-tirozinle bağlanma yapmadan bozunmasını en az seviyeye indirmek için, ortamın sıcaklığı 5°C civarında tutuldu. Fakat, pH'nın yüksek olmasından dolayı, aktifleşen her karboksil grubuna L-tirozinin takıldığını söylemek güçtür. 4 ayrı deneyle hazırlanan jellerdeki L-tirozin mmol miktarlarının birbirlerinden önemli derecede farklı olmalarını bu sebebe bağlayabiliriz (Tablo 2).

Diazolanmış sulfanilamidin L-tirozine kenetlenmesi, Cuatrecasas'ın öngördüğü şekilde ve $0.2\text{ M Na}_2\text{CO}_3$ lı ortamda, 3 saatlik karıştırma sonucu gerçekleştirildi. Burada Na_2CO_3 tamponlama görevi üstlenmektedir. Tablo 2 incelendiği zaman, inhibitörün farklı değerlerde kenetlendiği ve bunun bağlı L-tirozin miktarıyla doğru orantılı olmadığı görülmektedir. Bu durum diğer araştırmacıların hazırladıkları afinite jellerinde de gözlenmektedir (66,67). Azo bağıyla oluşan kenetlenme sonucu ortaya çıkan kırmızı renk, bağlanmanın gözle takip edilmesini sağlayarak, tarafımızdan uygulanan metodun avantajlarından birisini oluşturmaktadır.

Afinite jeli kromatografi için hazırlandıktan sonra, bu jelin karbonik anhidraz bağlama kapasitesi belirlenmişti. Kapasite tayin işlemlerinde kullanılmak üzere, önceden insan ve sığır eritrositlerinden ham karbonik anhidraz elde edildi. DeneySEL Bölümde de belirtildiği gibi, bu amaçla iki ayrı metod uygulandı. Bunlardan birincisi, hemoglobinin denatürasyonla uzaklaştırıldığı etanol-kloroform ekstraksiyonu, diğeri ise, hemolizattan hemoglobinin seçimli olarak adsorbe edildiği DEAE Sphadex-A50 iyon değiştirici

kromatografisi idi, Etanol-kloroform ekstraksiyonu hemolizattan hemoglobinin uzaklaştırmasında uzun zamandır kullanılan bir metoddur. Fazla vakit almaması, hemolizden sonra eritrosit zarlarının ayrılmasına gerek kalmaması ve her çeşit kana uygulanabilmesi gibi avantajlarının yanı sıra, büyük miktarda enzim hemoglobin çökeleği ile birlikte kaybedilmektedir (29,32,33, 53). DEAE Sephadex-A50 kromatografisi ile hemoglobin seçimli olarak kolona adsorbe olmakta ve karbonik anhidraz elüe edilmektedir. İnsan ve sığır kanıyla yaptığımız deneylerde, bu yöntemle karbonik anhidrazın hemoglobinden ayrılmasına çalışıldı. Fakat, yalnız insan hemolizatlarında başarılı olundu. Çünkü sığır hemoglobini ve karbonik anhidraz enziminin yapısındaki iyonlaşabilir gruplar, insan hemoglobini ve CA'ından oldukça farklıdır. Bu metodun hemolizattaki karbonik anhidrazın % 90 a yaklaşan bir verimle ve kromatografi gibi proteinlerin yapısını etkilemeyen bir yolla elde edilmesi avantajları vardır.

Hazırladığımız jelin karbonik anhidraz bağlama kapasitesi ile ilgili yapılan deney sonuçlarını tartışmadan önce, insan ve sığır karbonik anhidrazlarının kimyasal yapıları hakkında bazı bilgiler vermek faydalı olacaktır.

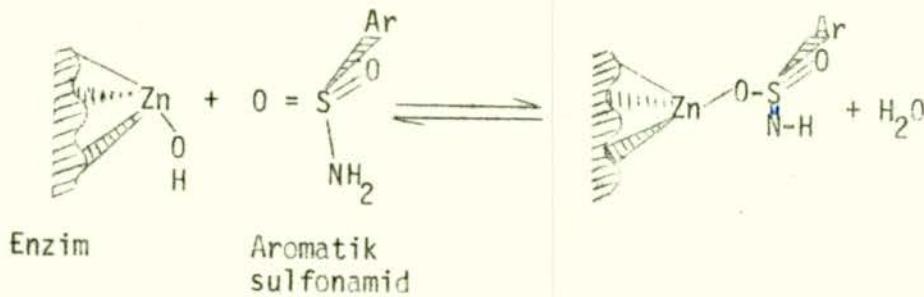
İnsan kanı eritrositlerinde A, B ve C sembolleriyle gösterilen ve sırayla % 5,83 ve 12 oranında üç karbonik anhidraz izoenzimi bulunmaktadır (73,90,92). Üç izoenzim de tek bir peptid zincirinden ibaret yapılarında 260 amino asit bulundurmaktadır. Molekül ağırlıkları yaklaşık 30:000 dir. A ve B izoenzimleri, amino asit bileşimleri, aktiviteleri ve immünolojik özellikleri bakımından birbirlerine son derece benzemektedir. Bu yüzden A izoenziminin B'nin bir varyantı olduğu ileri sürülmektedir ve her ikisi de "düşük aktiviteli" karbonik anhidraz sınıfına girmektedir. C izoenzimi ise, "yüksek aktiviteli" olup, amino asit dizilişi B izoenzimi ile % 59 luk bir benzerlik göstermektedir. 25°C da C izoenzimi CO₂ hidrataz aktivitesinin, HCAB'nin 13 misli kadar olduğu bildirilmektedir (21,92,93).

Değişik orijinli bütün karbonik anhidrazlarda olduğu gibi, insan B ve C izoenzimlerinin yapılarında aktiviteleri için gerekli olan Zn⁺² iyonu bulunmaktadır. Enzimin aktif bölgesinde yer alan Zn⁺² iyonu, tetrahedral bir kompleks oluşturarak, yine bu bölgede bulunan histidin amino asitlerinden 3 tanesinin N atomlarına ve bir OH⁻ iyonuna ligand bağlarıyla bağlanmaktadır. C izoenzimi için bu histidinlerin, 93,95 ve 118 nolu amino asitler, B izoenzimi için de 94, 96 ve 119 nolu amino asitler olduğu, yapılan amino asit dizilişi ve X-ışını kristallografisi deneylerinden anlaşılmaktadır (96,97,98).

Zn^{+2} iyonu, C izoenziminde $15 \text{ \AA}$, B izoenziminde ise, $12 \text{ \AA}$ derinliğinde bir oyuk (cavity) içindedir.

Sıgır eritrosit karbonik anhidraz enzimi ise, % 20 ve 80 oranlarında A ve B izoenzimlerinden ibarettir. Fakat, her iki izoenzim amino asit dizilişleri ve aktivite yönünden özdeş olup, "yüksek aktiviteli" izoenzim sınıfına girerler. CO_2 hidrataz aktiviteleri HCAC ye benzemektedir. Molekül ağırlıkları 29.000 olan her iki izoenzim, aynı izoelektrik pH lara, difüzyon ve sedimentasyon sabitlerine sahip olduklarından, elektroforezlerinde yalnız tek bant göstermektedirler. Aktif bölgelerindeki amino asit dizilişi HCAC ile tam bir homoloji arz etmektedir. Zn^{+2} iyonunun bağlanması da yine benzer şekilde olmaktadır (22,24,25,34,99,100,101).

Hazırladığımız afinite jeli, karbonik anhidrazı, enzimin bir inhibitörü olan sulfanilamid aracılığı ile tutmaktadır. Bölüm 1.4.1. de anlatıldığı gibi, aromatik ve heterosiklik sulfonamidler karbonik anhidraz enzimlerinin çok kuvvetli inhibitörleridir. Bu bileşiklerin enzimin aktif bölgesine bağlanma mekanizmaları açıklanmıştır. Bu olay şematik olarak şöyle gösterilebilir:



Burada, sulfonamid ($-SO_2NH_2$) grubunun enzime anyonik bir formda bağlandığı görülmektedir. Şöyle ki; Zn^{+2} nin dördüncü koordinasyon orbitalini işgal eden OH^- iyonu asidik karakterdeki $-SO_2NH_2$ den bir proton alarak suya dönüşmekte,

sulfonamid de $-\overset{\overset{O^-}{\parallel}}{S} = NH$ anyonu haline gelmektedir. Bu durum, yapılan rezonans Raman ve UV incelemeleriyle de doğrulanmıştır. Fakat, aromatik halkanın bağlanmadaki rolü henüz bilinmemektedir. Yukarıda şematize edilen bağlanmanın, pH ya son derece bağımlı olduğu açıktır. Çünkü, $-SO_2NH_2$ in anyona dönüşmesi ve $Zn-OH$ ligand bağının ayrışması pH dan etkilenen olaylardır (102, 103, 104, 105, 106). Sulfonamidler enzime yalnız Zn^{+2} aracılığı ile bağlanmamaktadır. Bunun yanı sıra, enzimin aktif bölgesinde iyonlaşabilir bazı gruplarla da etkileşme söz konusudur. Bunun en önemli delili, sulfonamidlerin Zn^{+2}

iyonu uzaklaştırılmış apo CA'a 10^{-3} M lık bir afinite ile bağlanmasıdır.

Hazırladığımız jelin enzimi adsorbsiyonunda, sulfonamid grubunun yanı sıra başka grupların da etkili olabileceği düşünülebilir. Ligandımız göz-önüne alındığında, sulfanilamidin azo bağıyla kenetlendiği L-tirozin fenol halkasında iyonlaşabilir ve asidik özellikte bir -OH grubu vardır. Bu grubun anyon formu azo bağlantısı sayesinde daha da kararlı hale gelmiştir. Enzimin aktif bölgesi 12-15 Å arasında bir derinlikte olduğu ve uzantı kolu yardımıyla sulfanilamid bu oyuktan içeriye girebildiğine göre, hemen kendisine takılı bulunan fenol halkası da oyuk içerisine isabet edecektir. Yüksek pH lar-da anyonlaşacak olan halkadaki -OH, çevresindeki amino asitlerin elektrofilik gruplarıyla etkileşecektir. Bu da taktığımız uzantı kolunun, pH ya bağımlı olarak, bağlanmada olumlu veya olumsuz rolü olabileceği kanısını vermektedir.

Yukarıdaki bilgilerin ışığı altında, hazırlanan afinite jelinin enzimi bağlayabilmesinde, enzim çeşidinin, pH nın, ortamın iyonik şiddet ve sıcaklığının etkili olabileceği görülmektedir. Çalışmamızda, söz konusu 4 faktör değişken olarak alındı ve kapasite tayinleri yapıldı.

Jelin insan karbonik anhidraz izoenzimleri karışımı, HCAB ve HCAC ile BCA tutma kapasiteleri deney sonuçları Tablo 3 te gösterilmişti. En yüksek bağlanmanın sıgır enzimi tarafından gerçekleştirildiği görülen değerlerden, insan C izoenziminin ikinci derecede adsorbe edildiği anlaşılmaktadır. B izoenzimi kapasitesinin en düşük seviyede olup, izoenzim karışımının ise, HCAC nin karışımdaki oranına uygun şekilde fazla olduğu yine tablodaki değerlerden ortaya çıkmaktadır. Elde edilen bağlanma dereceleri, enzimlerin aktiviteleriyle uygunluk göstermektedir. Yüksek aktiviteye sahip olan BCA ve HCAC, HCAB ye nisbeten daha çok tutulmuşlardır.

Genel olarak, hazırlanan afinite jelinin çok yüksek bir bağlama kapasitesine sahip olduğu görülmektedir. Literatürde kapasitesi hakkında bilgi verilen çalışmalarla karşılaştırıldığında, hepsinden yüksek değerler elde edildiği ortaya çıkmaktadır. Osborne ve Tashian hazırladıkları kolona, 1 g. kuru jel tarafından, 420 mg. HCAB bağlandığını bildirmişlerdir. Bu miktar jele takılı inhibitörün % 14 üne karşılık gelmektedir. Bizim çalışmamızda ise, söz konusu izoenzimin bağlanma oranı 509 mg. olarak elde edilmiş ve kolona kenetlenen sulfanilamidin % 7.9 u görev yapmıştır. Enzim bağlamada rol alan inhibitör yüzdesinin düşük olması normal bir sonuçtur. Çünkü, tarafımızdan matrikse, diğer araştırmacıların taktığından daha yüksek miktarda sulfanilamid bağlanmış ve adsorbe edilen enzim miktarı, bu yüksek orandaki

değerlere kıyas edildiğinden düşük çıkmıştır. Takılı sulfanilamidin büyük kısmının enzim bağlayamaması, kullanılan matriksin gözenekli yapısından ileri gelmektedir. Üretici firmanın CM Sephadex-C50 ile ilgili verdiği bilgilere göre, bu jelin gözenekleri molekül ağırlıkları 30.000 e kadar olan proteinleri tutmaktadır. Bu durumda, molekül ağırlığı 30.000 civarında olan enzimlerimiz, çoğunluğu gözenekler içerisinde bulunan inhibitörün çok az bir kısmıyla karşılaşmaktadır. Sonuç olarak da düşük verimde bir bağlanma gerçekleşmektedir.

İki insan izoenzimi ve sığır enzimi için, kapasitenin sıcaklığa bağımlılığını incelemek maksadıyla yaptığımız deneylerin sonuçları Tablo 4 ve Grafik 2 de gösterilmiştir. Burada, herbir enzim için, 2 ve 5°C larda en yüksek bağlanma ve sıcaklık yükseldikçe, paralel bir düşme görülmektedir. Bu düşüş, birinciderecede enzimin artan sıcaklıkla konformasyonunda meydana gelen değişmelere, daha sonra da bağlanmayı gerçekleştiren grupların iyonlaşmalarının sıcaklıktan etkilenmesine verilebilir.

pH faktörünün değişken olarak alındığı deneyler sonucunda, adsorbsiyon miktarlarında, bütün enzimler için, genellikle pH 7.5 tan aşağı ve 9.0 dan yukarı değerlerde bir azalma görülmektedir (Tablo 5 ve Grafik 3) .Bu azalma, herbir enzim için farklı oranlarda olmakla beraber, maksimum kapasitenin elde edildiği pH lar hemen hemen aynıdır. Bu pH değerleri, sulfanilamidin anyonik form kazandığı noktalar olup, yükseldikçe ortamda artan OH⁻, çinko iyonunun 4. koordinasyon başına inhibitörden daha kolay yerleşebileceğinden, kapasite düşmektedir. Enzimlerin, afinite jelimizdeki inhibitör ve uzantı koluyla etkileşen gruplarının farklı farklı olması, herbir enzim kapasitesinin pH dan, değişik oranlarda etkilenmesine neden olmuştur.

Afinite jelinin enzim tutma kapasitelerinin iyonik şiddetle değişimi Tablo 6 ve Grafik 4 te gösterilmiştir. Artan iyonik şiddet, bütün enzimlerde, birbirine paralel oranda bir azalmaya sebep olmaktadır. Çünkü ortamda iyon konsantrasyonu arttıkça, bağlanmada rol alan, iyon halindeki gruplar, zıt yüklü gruplar tarafından sarılmakta ve adsorbsiyon engellenmektedir. Tablo ve grafikten görüldüğü gibi, afinite kromatografisi çalışmalarında, en fazla I=0.15 iyonik şiddetine sahip çözeltilerin kullanılması uygun olacaktır. Çünkü bu değer üzerindeki iyon konsantrasyonları bağlanmayı azaltmaktadır.

Hazırladığımız afinite jelinden beklediğimiz bir başka özellik de jelin insan karbonik anhidraz izoenzimlerini ayırabilmesidir. Takılan sulfanilamid ligandı, bu açıdan uygun özelliklere sahiptir. Çünkü, bağlanma, izoenzimlere göre değişik oranda olmakta ve pH dan, her izoenzim için ayrı derecede etkilenmektedir. Bizim yaptığımız denemeler de bunu doğrulamaktadır.

Bunların yanısıra tek değerlikli anyonlar, karbonik anhidraz enzimini kuvvetle inhibe etmektedirler. Bazı anyonların da inhibisyon mekanizmaları ayrıntılı olarak incelenmiştir (42, 107, 108, 109). Enzime bağlanmaları, sulfonamidlerden çok farklı olup, düşük pH larda artmakta ve B izoenzimi için, C'ye göre daha yüksek oranda gerçekleşmektedir. Bazı örnekler verilirse; Cl^- iyonu için, pH=6.5 ta, K_i değerleri HCAB de 4×10^{-3} M HCAC de 2.70×10^{-1} M, pH=7.5 ta ise bu değerler 18×10^{-3} M ve 7.3×10^{-1} M, N_3^- iyonu için pH=5.8 de, 1.5×10^{-5} M ve 0.2×10^{-3} M, SCN^- iyonu için, pH=6.0 da 1.8×10^{-5} M ve 0.3×10^{-3} M, I^- iyonu için ise pH=7.5 da 0.7×10^{-6} M ve 8.7×10^{-3} M olmaktadır. Bu değerler incelendiği zaman, bu iyonları içeren çözeltiler aracılığıyla, insan izoenzimlerinin seçimli olarak elüe edilebilecekleri görülmektedir. Daha önceden yapılmış olan çalışmalarda benzer sulfonamid takılı jelden izoenzimlerin elüsyonu, farklı çözeltilerle gerçekleştirilmiştir. Bu araştırmacıların kullandıkları çözeltiler, konsantrasyon ve pH larıyla, her izoenzim için ayrı ayrı, Tablo 8 de gösterilmiştir.

Tablo 8- Başka araştırmacılar tarafından kullanılan izoenzim elüsyon çözeltileri

Araştırmacı	H C A B Tampon	elüsyonu Anyon çözeltisi	H C A C Tampon	elüsyonu Anyon çözeltisi
Falkbring ve arkadaşları	pH=7.5 0.1 M Tris- SO_4	0.1 M NaI	pH=7.5 0.1 M Tris- SO_4	0.01 M KCN
Whitney	pH=6.3 0.05 M Sodyum Fosfat	1 M NaCl	pH=5.6 0.1 M Sodyum Asetat	0.5 M NaClO_4
Osborne ve Tashian	pH=7.0 0.1 M Tris- SO_4	0.4 M KI	pH=7.5 0.1 M Tris- SO_4	0.2 M KCN + 0.2 M Na_2SO_4
Khalifah ve arkadaşları	pH=7.5 0.75 M Tris- SO_4	0.2 M KI	pH=7.0 0.75 Bistris- SO_4	0.4 M NaN_3

Tek değerli anyonların K_i değerleri ve diğer araştırmacıların uyguladıkları metodlar gözönüne alınarak, HCAB ve HCAC izoenzimlerinin seçimli izolasyonunu sağlamak için 5 ayrı deneme yapıldı.

Bunlardan birincisinde kolona asetazolamid konsantrasyon gradienti uygulandı. Çünkü asetazolamidin HCAC ye afinitesi HCAB den fazladır. Tahmin edildiği gibi kolondan önce HCAC gelmeye başladı. Fakat elüsyon devamında HCAB de beraberinde fraksiyonlarda görüldüğünden tam bir ayrılma başarılamadı (Grafik 7).

İkinci denememiz Cl^- iyonu konsantrasyon gradienti uygulaması ile gerçekleştirildi. Cl^- iyonunun izoenzimlere ilgisinin bir ölçüsü olan K_i değerleri, HCAB ve HCAC için birbirinden çok farklı olduğundan, düşük Cl^- konsantrasyonlarında önce HCAB ve konsantrasyon arttıkça da HCAC kolondan elüe edilebildi. Elüsyon grafiğindeki her iki tepe eğrisi altındaki fraksiyonların disk jel elektroforezi bantları ayrılmanın tam olarak sağlandığını gösterdi (Grafik 8 ve Şekil 4).

pH gradienti uygulaması ise, 0.05 M SCN^- iyonu konsantrasyonunda yapıldı. pH, 10 dan 2 ye düşürülerek gerçekleştirilen elüsyonda, adsorbe edilmiş enzimlerin ancak bir kısmı kolondan geldi (Grafik 9). Bu da sulfonamid-enzim ayrışmasının, bağlanmada olduğu kadar pH ya bağımlı olmadığını göstermektedir. Nitekim bazı araştırma sonuçları da bunu doğrulamaktadır (64,94).

HCAB nin Cl^- ve arkasından HCAC nin N_3^- iyonları ile elüe edildiği dördüncü denemede, izoenzimlerin tam olarak ayrılması başarısız oldu. Bu iyonlar elüsyonda kullanılmadan önce, Cl^- ün HCAB ye afinitesinin HCAC ye göre daha yüksek olması gözönüne alındı. Fakat ayrı ayrı birleştirilen peakler altındaki elüatlara uygulanan disk jel elektroforezi sonucu, HCAC ye karşılık gelen jelde B izoenzimi bantları ortaya çıktı. Bu da elüe edilen HCAC ile birlikte bir miktar B izoenzimi de geldiğini göstermektedir. Bununla beraber HCAB nin saf halde izole edildiği görülmektedir (Grafik 10 ve Şekil 5).

Son olarak ta, I^- ve SCN^- iyonlarıyla elüsyon yapıldı. HCAB, I^- çözeltisi ile ayrıldı. Çünkü bu anyonun B izoenzime olan afinitesi, C izoenzime olandan yaklaşık 1000 kez daha fazladır. Bu, HCAB nin seçimli elüsyonu için yeterli olmaktadır. Daha sonra kolonda kalan HCAC, SCN^- çözeltisi ile indirildi. Yapılan disk jel elektroforezi jel fotoğrafları üzerinde ortaya çıkan tek bant, ayrılmanın tam olduğunu göstermektedir (Grafik 11 ve Şekil 6).

Bu denemelerin sonucu olarak, hazırlanan afinite jelinin, Cl^- iyonu konsantrasyon gradienti, Cl^- - N_3^- ve I^- - SCN^- iyon çiftleri çözeltileri ile, insan karbonik anhidraz izoenzimlerinin birbirinden ayrılmasında kullanılabileceği görülmektedir.

Sığır karbonik anhidraz izoenzimleri, kinetik özellikleri bakımından, hemen hemen özdeşler. Bunların sulfonamidleri bağlama afiniteleri de aynıdır. Tek değerlikli anyonlar tarafından aynı derecede inhibe edildiklerinden,

hazırlanan afinite jelinin sığır eritrosit izoenzimlerini ayırmada kullanılamayacağı açıktır (27,37,42). Bundan dolayı çalışmamızda, bu amaca yönelik denemeler yapılmadı.

Sentezlenen afinite jelinin eritrositlere nisbeten düşük oranda karbonik anhidraz ihtiva eden dokulardan enzim izolasyonunda da kullanılabileceğini göstermek için sığır böbreği homojenatı ile bir deney yapıldı. Böbrek hücreleri sitoplazmasında çözünmüş halde bulunan karbonik anhidraz, beher içinde jele adsorbe edildikten sonra, kolona uygulanarak elüe edildi. Yaklaşık 250 g. sığır böbreği homojenatından 0.082 g. saf enzim elde edildi. Bu enzim, disk jel elektroforezinde sığır eritrosit ile paralel yürütüldü. Her iki enzimin bantları Şekil 7 deki jel fotoğraflarından görülmektedir. Protein bantlarının anoda doğru aynı uzaklıkta yer almaları, eritrosit ve böbrek karbonik anhidraz enzimlerinin aynı protein olduklarını göstermektedir. Daha önceden insan ve sığır böbrek karbonik anhidrazı ile yapılan elektroforetik, immünolojik çalışmalar ve sedimentasyon ve jel filtrasyon deneyleri sonucunda, böbrek enziminin "yüksek aktiviteli" eritrosit enzimi ile aynı olduğu bildirilmiştir (68,110).

Çalışmamızın son bölümünü apo karbonik anhidraz enziminin hazırlanması ve bunun tekrar aktivasyonu oluşturmıştır. Enzimin "apo" hali, enzimden Zn^{+2} iyonunun bir çelatlayıcı aracılığıyla uzaklaştırılması sonucu, geride kalan protein kısmıdır.

Karbonik anhidraz keşfedilen ilk metalli enzim olup, diğer metal iyonlarıyla Zn^{+2} nin yer değiştirme reaksiyonlarının en çok incelendiği proteindir. Apo hali oldukça kararlı olan bu enzim, aynı zamanda ultra eser miktardaki Zn^{+2} tayinlerinde kullanılmaktadır. Apo enzimin ortamdaki Zn^{+2} iyonlarını bağlayarak, tekrar kazandığı aktivitesinin ölçülmesi sonucu, 10 ng./ml. duyarlılıkla çinko miktarı belirlenebilmektedir (111,112,115).

Deneylerimizde, çelatlayıcı olarak piridin-2,6-dikarboksilik asit kullanılmıştır. Bu bileşiğin Zn^{+2} ile meydana getirdiği kompleksin ayrışma sabiti enziminkinden çok küçük olduğu için, enzimin aktif bölgesindeki çinkoyu kolayca koparmaktadır. Bu işlem pH 7.0 de ve çok kısa bir süre içinde (2 saat) gerçekleştirildiğinden, daha önceleri kullanılan ortofenantrolinden daha uygundur. Bu bileşikle apo enzim, 7-10 gün süren bir diyaliz sonucu ve pH 5.5 ta elde edilebilmekteydi (20,80,81,113,114).

0.1 M piridin-2,6-dikarboksilik asit çözeltisine karşı 2 saat müddetle diyaliz edilen enzim çözeltisi, daha sonra, afinite kolonuna uygulandı,

Apo CA aktif enzime göre, afinite jeline 1000 kez daha düşük bir ilgi ile bağlandığı için, Zn^{+2} iyonu uzaklaştırılmamış enzimden kolayca ayrıldı. Diyaliz işleminden önce ve sonra ve kolondan alınan enzim çözeltilerinde atomik absorpsiyonla çinko tayini yapıldı. Bu çözeltilerdeki çinko miktarları ve enzim aktiviteleri Tablo 7 de gösterilmiştir. Değerler incelendiğinde başlangıçtaki enzimin % 89 unun çinkosu uzaklaştırılarak aktivitesini kaybettiği görülmektedir. Afinite kolonundan elüe edilen enzim çözeltisinde önemsiz miktarda Zn^{+2} iyonuna rastlanması ve yine çözeltide hiç karbonik anhidraz aktivitesi belirlenememesi, sentezlediğimiz jelin apo enzimi, aktif enzimden ayırmada oldukça başarılı olduğunu ortaya koymaktadır.

Hazırlanan apo enzim daha sonra artan oranlarda $ZnSO_4$ ile tekrar aktive edildi. Aktivasyon dereceleri esteraz yöntemiyle belirlendikten sonra, ilâve edilen $ZnSO_4$ ile aktivitedeki değişiklik grafiğe çizildi ve bir doğru elde edildi. Bu da apo enzimin aktivitesinin ortamdaki Zn^{+2} miktarıyla doğru orantılı olarak arttığını göstermektedir. Bu surette, hazırlanacak standart Zn^{+2} çözeltileri ile elde edilen doğrudan her hangi bir çözeltideki Zn^{+2} iyonu miktarını tesbit etmek mümkün olabilecektir. Bu deneme ile apo karbonik anhidrazın analitik amaçla kullanılabileceği bir kez daha doğrulanmış oldu.

"Giriş" bölümünde anlatıldığı gibi afinitekromatografisi, ayrılması güç biyolojik ünitelerin, özelliklerinden hiç birşey kaybetmeden, kısa bir süre içinde saflaştırılmalarını sağlamaktadır. Çalışmalarımızda, hemolizat ve böbrek homojenatındaki karbonik anhidraz, afinite jeliyle 75 dak. karıştırıldıktan sonra, kolon aracılığıyla elüe edildi. Adsorpsiyon ve elüsyon işlemleri afinite kromatografisi dışındaki saflaştırma metodlarına kıyasla 5-10 kez daha kısa bir süre içerisinde gerçekleştirilebilmektedir. Özellikle, düşük oranlarda enzim içeren dokulardan karbonik anhidraz saflaştırılmasında, bu süre avantajı oldukça ağır basmaktadır.

Başlangıçta, karbonik anhidraz enzimi afinite kromatografisinde, bir metod geliştirmek amacıyla olduğumuz belirtilmişti. Sonuç olarak, önceki araştırmacıların hazırladıkları kolonlarda ortaya çıkan bazı dezavantajların en az seviyeye indirildiği bir afinite jeli sentezlendi. Kapasite, sentez reaksiyonları süresi ve uzantı kolu yönünden farklı avantajlara sahip olan metodumuz, değişik orijinli karbonik anhidraz enzimlerinin özellikleri yönünden incelenmesine, izolasyonlarını kolaylaştırarak, imkân verecektir.

Jelin özellikleriyle ilgili yaptığımız denemeler sonucunda, kromatografi işleminin en verimli şekilde gerçekleştirilebileceği şartlar elde edildi. Enzimin kolona maksimum adsorpsiyonu 2 ile 5°C larda, pH 8-9 arasında ve 0.15 ten düşük iyonik şiddette gerçekleştiği görüldü. İnsan eritrosit izo-

enzimlerini ise, 1.5 M Cl^- iyonu konsantrasyon gradienti, $1 \text{ M Cl}^- - 0.4 \text{ M N}_3^-$ veya $0.4 \text{ M I}^- - 0.2 \text{ M SCN}^-$ iyon çözeltileri ile seçimli olarak elüe edilebildiği sonucuna varıldı.

Hazırlanan jel bir çok kez kullanıldığı halde fiziksel özelliklerinden ve enzim tutma yeteneğinden hiç birşey kaybetmemiştir. Hatta kapasite ölçümlerinde kuruttuğumuz jellerin bile özelliklerini aynen korudukları gözlenmiştir. Bakteriye karşı koruyucu olarak NaN_3 içeren bir tamponda uzun süre saklanabileceği, dekstran yapısında bir polisakkarit olan Sephadex için üretici firmanın tavsiye ettiği pH ve sıcaklık şartlarına uyulduğu takdirde birçok kez enzim izolasyonunda kullanılabileceği kanısına varılmıştır.

5. Ö Z E T

Çalışmamızda, yüksek oranda karbonik anhidraz enzimi (E.C.4.2.1.1) tutma kapasitesine sahip bir afinite kolonu, değişik bir metod uygulanarak hazırlandı. Kolonda kullanılan jel, üç ayrı reaksiyon sonucu sentezlendi. Önce, matriks olarak görev yapan CM Sephadex, serbest karboksil grupları üzerinden, N-etoksikarbonil-2-etoksi-1,2-dihidrokinolin (EEDQ) ile aktifleştirildi. Sonra, aktifleştirilmiş matrikse L-tirozin, amid bağıyla bağlandı. 3. basamakta da, diazolan p-amino benzen sulfonamid (sulfanilamid), jele takılı olan L-tirozinin fenol halkasına kenetlendi. Bu işlemler sonucunda, iyi akış özelliklerine ve uzunluk ve kimyasal yapı yönünden diğer araştırmacılardan farklı uzantı koluna sahip olan bir afinite jeli elde edildi.

Hazırlanan kolonun insan karbonik anhidraz izoenzimleri (HCAB ve HCAC) ve sığır eritrosit karbonik anhidrazı (BCA) tutma kapasiteleri ve bu kapasitelerin sıcaklık, pH ve iyonik şiddetle değişimleri incelendi. 1 g. kuru CM Sephadex den hazırlanan jelin, 509 mg. HCAB, 554 mg. HCAC ve 567 mg. BCA adsorbe ettiği bulundu. Maksimum adsorbsiyon, 2-5°C sıcaklıkta, 8-9 arasındaki pH larda ve 0.15 ten düşük iyonik şiddette gerçekleşti.

Hemolizattan HCAB ve HCAC nin afinite kolonuyla seçimli olarak elüsyonu denendi. Bu izoenzimlerin (1) Cl^- iyonu konsantrasyon gradienti, (2) $\text{Cl}^- - \text{N}_3^-$ ve (3) $\text{I}^- - \text{SCN}^-$ iyonları çözeltileri elüsyonu ile birbirlerinden ayrılabilirdikleri görüldü. Yine hazırlanan kolonla sığır böbreği homojenatından karbonik anhidraz izole edilerek, düşük oranlarda enzim içeren dokulardan da CA ın saflaştırılabileceği gösterildi.

Ayrıca, piridin-2,6- dikarboksilik asit çözeltisine karşı aktif enzim diyalizlenerek apo enzim elde edildi. Daha sonra, afinite kolonuyla saflaştırılan apo enzim, artan oranlarda çinko sülfat ilâvesiyle reaktif edildi. Aktivasyonun, katılan çinko miktarıyla doğru orantılı olarak arttığı gözlemlendi. Çalışma süresince çözeltilerde enzimin saflığı poliakrilamid disk jel elektroforezi ile kontrol edildi. Kolon fraksiyonlarında kalitatif protein tayini 280 nm. de absorbanları ölçülerek yapılırken, yine çözeltilerdeki protein ve enzim miktarları Lowry metoduyla ve enzimlerin ekstinksiyon katsayıları yardımıyla belirlendi. Enzimin CO_2 hidrataz aktivitesi Wilbur-Anderson metoduyla, esteraz aktivitesi ise p-nitrofenil asetat esterinin hidrolizi sonucu oluşan p-nitrofenolün 348 nm. deki optik dansitesiyle tesbit edildi.

Deneylerimiz boyunca elde edilen sonuçlar literatürde karşılaşılan araştırmalarla karşılaştırıldı.

S U M M A R Y

In this study, an affinity column having a high carbonic anhydrase (E.C.4.2.1.1) binding capacity, was prepared by a different method. The gel used in the affinity column, was synthesized by means of three consecutive reactions. At first, the free carboxylate groups of CM Sephadex matrix were activated by N-ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydro quinoline (EEDQ). Then, L-tyrosine was bound to the activated matrix by means of a covalent amide bond. At the last step, p-aminobenzene sulfonamide (sulfanilamide) was diazotized and then coupled to the phenol ring of the L-tyrosine. As the result of these reactions, an affinity gel having good flow properties and a spacer-arm which was different from the gels prepared by other researchers with respect to its length and chemical structure.

The binding capacities of the affinity gel for the human carbonic anhydrase isozymes (NCAB and HCAC) and bovine erythrocyte carbonic anhydrase (BCA) were determined. The capacities at different temperatures, pH's and ionic strengths were also found. It was seen that 509 mg. of NCAB, 554 mg. of HCAC and 567 mg. of BCA were adsorbed by an amount of the affinity gel prepared from 1.0 gram of dry CM Sephadex. Maximum binding was achieved at temperatures 2°C and 5°C, with pH's between 8 and 9 and with ionic strengths below 0.15.

Some experiments for the selective elution of NCAB and HCAC isozymes from hemolysates of human blood were done by the affinity column. It was seen that these human isozymes had been isolated separately by the elution solutions of (1) Cl^- with concentration gradient, (2) $\text{Cl}^- - \text{N}_3^-$ and of (3) $\text{I}^- - \text{SCN}^-$.

By means of the prepared affinity column, the carbonic anhydrase of the bovine kidney homogenate was isolated. This showed that our gel could be successfully used to purify the carbonic anhydrase of the tissues with low enzyme contents. Besides, apo carbonic anhydrase was obtained by dialyzing the native carbonic anhydrase against pyridine-2,6-dicarboxylic acid solution. This apoenzyme was purified by affinity chromatography and then reactivated by adding ZnSO_4 of increased amounts. It was seen that the reactivation of the enzyme was directly proportional to the zinc added.

During our experiments, the purity of the enzymes in the solutions was checked by means of polyacrylamide disc gel electrophoresis. The protein contents of the eluted fractions were determined qualitatively by measuring their absorbances at 280 nm. The amounts of proteins and enzymes in the solutions were found by Lowry method and by using the extinction coefficients of the enzymes. CO₂ hydratase activity

6- K A Y N A K L A R

1. LEHNINGER, A.L., (1976) " Enzymes: Kinetics and Inhibition", Biochemistry, New York, Worth Publishers, Inc., 2nd ed.,p. 183-212.
2. KAROL,S., INCEÖĞLU,Ö.,AYVALI,C.,GÖLER,A.,IŞIK,K.,AYSU,F., ve GÖRPİNAR, N., (1978) "Genetik Şifre", Modern Biyoloji, Ankara, Türk Tarih Kurumu Basımevi, Cilt-1, Sayfa 242.
3. BİLGE,M., (1972) "Sibernetik Prensiplerle Hücre Fonksiyonları", Hücre Bilimi, İstanbul, Baha Matbaası, Sayfa 99.
4. MAHLER,H.R., and CORDES,E.H., (1969)" Biosynthesis of Proteins", Biological Chemistry, Tokyo, John Weatherhill Inc., p.752.
5. WATSON,J.D., (1968) "Gen, Yapı ve Fonksiyonu", (çev. A.Güenalp), Gen ve Moleküler Biyolojisi, Ankara, Hacettepe Üniversitesi yayınları,Sayfa 202.
6. RODWELL,V. (1975) "Enzymes", (ed. H.A.Harper),Review of Physiological Chemistry, California, Lange Medical Publications, 15th ed., p.126-31
7. KACHAR,F.J., and MOSS,W.D., (1976) "Enzymes",(ed. N.Tietz), Fundamentals of Clinical Chemistry, London, W.B.Saunders Company,p.565.
8. MELDRUM, N.U., and ROUGHTON, F.J.W., (1933), J.Physiol., 80,p.113-42.
9. POCKER,Y.,and SARKANEN, S., (1979)"Carbonic Anhydrase: Structure,Catalytic Versatility and Inhibition", Advances in Enzymology, Interscience, New York, Vol. 49,p.149-273.
10. CARTER,M.J., (1972), Biol. Rev., 42, p.465-513.
11. MAREN,T.H., (1967), Physiol. Rev., 47, p.595-781.
12. DAVENPORT, H.W., and FISHER, R.B., (1938), J.Physiol. London, 94, p.16.
13. VAN GOOR,H., (1948), Enzymologia, 13,p.73-164.
14. POLYA, J.B., and WIRTZ,A.J., (1965),Enzymologia ,30,p.27-37.
15. HARPER,H.A., (1975)" Chemistry of Respiration" Review of Physiological Chemistry, California, Lange Medical Publications, 15th ed. p.222-25.
16. a.g.e., "The Kidney and the Urine", p.411.
17. POCKER,Y., and Ng, JOAN S.Y., (1974), Biochemistry, 13, p.5116-20.
18. POCKER,Y., and Ng, JOAN S.Y., (1973), Biochemistry, 12, p.5127-34.
19. TOBIN,A.J., (1970),J.Biol.Chem., 245, p.2656-66.
20. LINDSKOG,S., HENDERSON,L.E.,KANNAN,K.K., LILJAS,A.,NYMAN,P.O., and STRANDBERG,B., (1971)" Carbonic Anhydrase", The Enzymes, 3rd ed. Vol. 5(ed.P.D. Boyer), New York, Acedemic Press, p.587-665.
21. GIBBONS,B.G., and EDSALL,J.T., (1964), J.Biol. Chem., 239, p.2539-44.
22. KHALIFAH,R.G., (1971), J.Biol. Chem. 246, p.2561-73.

23. Mc INTOSH, J.E.A., (1969), *Biochem.J.*, 114, p.463-76.
24. KERNOHAN, J.C., (1965), *Biochim. Biophys. Acta.*, 96, p.304-17.
25. CARTER, M.J., (1971), *Biochim. Biophys. Acta.* 235, p. 222-36.
26. Mc INTOSH, J.E.A., (1970), *Biochem. J.*, 120, 299-310.
27. CARTER, M.J., and PARSONS, D.S., (1972), *J. Physiol.*, 220, p.465-78.
28. RICKLI, E.E., GHAZANFAR, S.A.S., GIBBONS, B.H., and EDSALL, J.T., (1964), *J. Biol. Chem.*, 239, p. 1065-78.
29. FURTH, A.J., (1968), *J. Biol. Chem.*, 243, p. 4832-41.
30. MAYNARD, J.R., and COLEMAN, J.E., (1971), *J. Biol. Chem.*, 246, p. 4455-64.
31. Mc KINLEY, DANA N., and WHITNEY, P.L., (1976), *Biochim. Biophys. Acta.*, 445, p. 780-90.
32. EDSALL, J.T., (1963), *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 151, p.41-63.
33. ARMSTRONG, J. Mc D., MYERS, D.V., VERPOORTE, J.A., and EDSALL, J.T., (1966), *J. Biol. Chem.*, 214, p. 5137-49.
34. NYMAN, P.O., and LINDSKOG, S., (1964), *Biochim. Biophys. Acta.*, 85, p.141-51.
35. POCKER, Y., and MEANY, J.E., (1965), *Biochemistry*, 4, p. 2535-41.
36. KAISER, E.T. and Lo, K.W., (1969), *J. Am. Chem. Soc.* 91, p. 4912-18.
37. WELLS, J.W., KANDEL, S.I., KANDEL, M., and GORNALL, A.G., (1975), *J. Biol. Chem.* 250, p. 3522-30.
38. VERPOORTE, J.A., MEHTA, S., and EDSALL, J.T., (1967), *J. Biol. Chem.*, 242, p. 4221-29.
39. POCKER, Y., and SARKANEN, S., (1978), *Biochemistry*, 17, p.1110-17.
40. ROUGHTON, F.J.W., and BOOTH, V.H., (1946), *Biochem. J.* 40, p.319-30.
41. MAGID, E., (1968), *Biochim. Biophys. Acta.*, 151, p.236-44.
42. POCKER, Y., and STONE, J.T., (1968), *Biochemistry*, 7, p.2936.
43. PFAFF, K., and KUJAWA, M., (1979), *Nahrung*, 23, p.91-3.
44. WILBUR, K.M., and ANDERSON, N.G., (1948), *J. Biol. Chem.*, 176, p.147-54.
45. MELDRUM, N.U., and ROUGHTON, F.J.W., (1933), *J. Physiol. (London)*, 80, p.147-54.
46. ROUGHTON, F.J.W., and BOOTH, V.H., (1938), *Biochem. J.*, 32, p.2048-58.
47. PHILPOT, F.J., and PHILPOT, J. St. L. (1936), *Biochem. J.*, 30, p.2191-4.
48. BRINKMAN, R., (1933), *J. Physiol. (London)*, 80, p.171-3.
49. MAREN, C.H., (1960), *J. Pharmac. exp. Ther.*, 130, p.26-9.
50. DAVIS, R.P., (1963) "The measurement of carbonic anhydrase activity", In *Methods of Biochemical Analysis*, Vol. XI, (ed. D. Glick), New York, Interscience, p. 307-28.
51. HANSEN, P., and MAGID, E., (1966), *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 18, p.21-32.

52. CARTER, M.J., and PARSONS, D.S., (1968), *J. Physiol. (London)*, 198, p.13-15.
53. Mc INTOSH, J.E.A., (1968), *Biochem. J.*, 109, p.203-7.
54. ROUGHTON, F.J.W., and CHANCE, B., (1963), "Rapid Reactions", *Techniques of Organic Chemistry*, Vol.8, (ed. A. Weissberger), New York, Interscience, p.703-92.
55. AXEN, R., PORATH, J., and ERNBACK, S., (1967), *Nature*, 214, p.1302-4.
56. CUATRECASAS, P., (1970), *J. Biol. Chem.*, 245, p.3059-65.
57. CUATRECASAS, P., and ANFINSEN, C.B., (1971), *Methods in Enzymology*, Vol. 22, (ed. W. Jacoby), Academic Press, New York and London, p.345.
58. Pharmacia Fine Chemicals, "Affinity Chromatography; principles and methods" Lijungföretagen AB, Örebro, Sweden.
60. FRIDBORG, K., KANNAN, K.K., LILJAS, A., LUNDIN, J., STRANDBERG, B., STRANDBERG, R., TILANDER, B., and WIREN, G., (1967), *J. Mol. Biol.*, 25, p.505.
59. MANN, T., and KEILIN, D., (1940), *Nature*, 146, p.164.
61. BERGSTÄN, P.C., VAARA, I., LÖVGREN, S., LILJAS, A., KANNAN, K.K., and BEGTSSON, U. (1972), "Oxygen Affinity of Hemoglobin and Red Cell acid-base status", *Alfred Benzon Symposium*, (ed. M. Röth and D. Astrup), Munksgaard, Copenhagen, p.345.
62. BINFORD, J.S., LINDSKOG, S. and WADSSÖ, I., (1974), *Biochim. Biophys. Acta.*, 341, p.345.
63. MAREN, T.H., (1963), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 139, p.129.
64. KING, R.W., and BURGEN, A.S.V., (1976), *Proc. Roy. Soc. (London)*, Ser. B, 193, p.107.
65. FALKBRING, S.O., GÖTHE, P.O., NYMAN, P.O., SUNDBERG, L., and PORATH, J., (1972), *FEBS Lett.*, 24, p.229-35.
66. WHITNEY, P.I., (1974), *Anal. Biochem.*, 57, p.467-76.
67. OSBORNE, W.R., and TASHIAN, R.E., (1975), *Anal. Biochem.*, 64, p.297-303.
68. WISTRAND, Per J., LINDAHL, S., and WAHLSTRAND, T., (1975), *Eur. J. Biochem.*, 57, p.189-95.
69. CHAMPAGNOL, F., (1976), *J. Chromat.*, 120, p.489-90.
70. WISTRAND, Per J., and KNUTTILA, K.G., (1980), *Exp. Eye Res.*, 30, p.277-90.
71. SEGEL, I.H., (1968), *Biochemical Calculations*, John Wiley and Sons, Inc., New York, p.403.
72. LOWRY, O.H., ROSENDRUGH, N.J., FARR, A.L., and RANDALL, R.J., (1951), *J. Biol. Chem.*, 193, p.265-75.
73. NYMAN, P.O., (1961), *Biochim. Biophys. Acta.*, 52, p.1.
74. *Handbook of Chemistry and Physics*, 1974-75, 55th ed. CRC Press.

75. SUNDARAM P.V., (1974), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 61, p.717-23.
76. TELEFONCU, A., (1980), Stiren-Metakrilik asit kopolimerlerine kovalant bağlı tripsin türevlerinin hazırlanması ve özelliklerinin incelenmesi. (Doçentlik tezi) Ege Univ. Kimya Fak., Bornova, İZMİR.
77. HARPER, H.A., (1975), "Blood, Lymph and Cerebrospinal Fluid", *Review of Physiological Chemistry*, p.207.
78. BREWER, G.J., and SING, C.F., (1970), *An Introduction to Isozyme Techniques*, Academic Press, Inc. New York, p.54.
79. Pharmacia Fine Chemicals, "Sephadex Ion Exchangers; a guide to ion exchange chromatography", (1970), Uppsala, Sweden.
80. HUNT, J.B., RHEE, Moo-J., and STORM, C.B., (1977), *Anal. Biochem.*, 79, p.614-17.
81. KIDANI, Y., HIROSE, J., and KOIKE, H., (1976), *J. Biochem. (Tokyo)*, 79, p.43-51.
82. Pharmacia Fine Chemistry, "Pharmacia Gel Electrophoresis System" (1974), Uppsala, Sweden.
83. JOLLIF, C.R., (1976), "Electrophoresis", *Chemistry for the Clinical Laboratory*, (ed. W.C. White, M.M. Erickson and S.C. Stevens), Saint Louis, The C.V.-Mosby Comp. 4th ed., p. 528.
84. DAIES, B.J., (1964), *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 121, p.404-27.
85. E.C. Apparatus Corp. *Electrophoresis Catalogue*, (1974), St. Petersburg, USA.
86. RENDINA, G., (1971), *Experimental Methods in Modern Biochemistry*, W.B. Saunders Comp., Philadelphia, p.83-90.
87. Pharmacia Fine Chemicals, (1975), *Sephadex; Gel Filtration in Theory and Practice*, Uppsala, Sweden.
88. KANDEL, M., GORNALL, A.G., WONG, S-Chu.C., and KANDEL, S.I., (1970), *J. Biol. Chem.*, 245, p. 2444-50.
89. DARLING, G.J., CHATTOPADYAY, S.K., BROWN, H.D., BARKER, C.W., and VINCENT, J.K., (1974), *Biotechnol. Bioeng.*, 16, p. 1425.
90. LAURENT, G., CHARREL, M., CASTAY, M., NAHON, D., MARRIQ, C., and DERRIEN, Y., (1962), *C.R. Soc. Biol.*, 156, p. 1461.
91. RICKLI, E.E., and EDSALL, J.T., (1962), *J. Biol. Chem.*, 237, p. 258.
92. ANDERSSON, B., NYMAN, P.O., and STRID, L., (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 48, p. 138.
93. HENDERSON, L.E., HENRIKSSON, D., and NYMAN, P.O., (1973), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 52, p. 138.
94. TAYLOR, P.V., KING, R.W., and BURGEN, A.S.V., (1970), *Biochemistry*, 9, p.2638.

95. KHALIFAH, R.G., STRADER, D.J., BRYANT, S.H., and GIBSON, S.M., (1977), *Biochemistry*, 16, p.2241.
96. NOTSTRAND, B., VAARA, I., and KANNAN, K.K., (1974), "Molecular Structure", *Proc. Int. Conf. Isozymes*, 3rd., Vol.1, (ed. C.C. Markert), Academic Press, New York, p.575.
97. VAARA, I., (1974), "The Molecular Structure of Human Carbonic Anhydrase, Form C and Inhibitor Complexes", Inaugural Dissertation, UUIC-B22-2, Uppsala University, Sweden.
98. KANNAN, K.K., NOTSTRAND, B., FRIDBERG, K., LOVGREN, S., OHLSSON, A., and PETEF, M (1975), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, p.51.
99. LINDSKOG, S., (1960), *Biochim. Biophys. Acta.*, 39, p.218.
100. LINDSKOG, S., and MALMSTRÖM, B.G., (1960), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2, p. 213.
101. WONG, K.P., and TANFORD, C., (1973), *J. Biol. Chem.*, 248, p. 8518.
102. KING, R.W., and BURGEN, A.S.V., (1970), *Biochim. Biophys. Acta.*, 207, p.278.
103. CHEN, R.F., and KERNOHAN, J.C., (1967), *J. Biol. Chem.*, 242, p.5813.
104. KUMAR, K., KING, R.W., and CAREY, P.R., (1974), *FEBS Let.*, 48, p.283.
105. CAMPBELL, I.D., LINDSKOG, S., and WHITE, A.I., (1974), *J. Mol. Biol.*, 90, p.469.
106. CAMPBELL, I.D., LINDSKOG, S., and WHITE, A.I., (1975), *J. Mol. Biol.*, 98, p.597.
107. DENNARD, A.E., and WILLIAMS, R.J.P., (1966), *Transition Metal Chemistry*, Vol.2, (ed. R.L. Carlin), Dekker, New York, p.115.
108. WILLIAMS, R.J.P., (1967), *Proc. Colloq. Protides Biol. Fluids*, 14, p.25.
109. LINDSKOG, S., (1970), *Struct. Bonding (Berlin)*, 8, p.153.
110. GARCAN, D., BARLATIER, A., LUCEIONI, F., and REYNOUD, J., (1975), *C.R. Hebd. Seances Acad. Sci., Ser D*, 281, p.1761-4.
111. COLEMAN, J.E., (1973), *Inorganic Biochemistry*, (ed. G.L. Eichhorn), Vol.1, Elsevier, New York, p.488-548.
112. COLEMAN, J.E., (1971), *Progress in Bioorganic Chemistry*, (ed. E.T. Kaiser and F.T. Kezdy), Vol.1, Wiley, New York, p.159-344.
113. LINDSKOG, S., and NYMAN, P.O., (1964), *Biochim. Biophys. Acta.*, 85, p.462-74.
114. TAYLOR, J.S., and COLEMAN, J.E., (1971), *J. Biol. Chem.*, 246, p.7058.
115. KOBAYASHI, K., FUJIWARA, K., HARAGUCHI, H., and FUWA, K., (1979), *Bull. Chem. Soc. Japan*, 52, p.1932.

