

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FRUKTOZ 1,6 BİS FOSFAT ALDOLAZ ENZİMİNİN
NORMAL VE DİYABETLİ PLASENTALARDAN SAFLAŞTIRILARAK
ENZİM AKTİVİTESİ VE KİNETİKLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI

Blm. Uzm. Neşe Hayat AKSOY

Biyokimya Programı
DOKTORA TEZİ

ANKARA

2005

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FRUKTOZ 1,6 BİS FOSFAT ALDOLAZ ENZİMİNİN
NORMAL VE DİYABETLİ PLASENTALARDAN SAFLAŞTIRILARAK
ENZİM AKTİVİTESİ VE KİNETİKLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI

Blm. Uzm. Neşe Hayat AKSOY

Biyokimya Programı

DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Pakize DOĞAN

ANKARA

2005

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
KISALTMALAR DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Fruktoz 1,6-Bisfosfat Aldolaz Enziminin Yapısı, Görevi ve Fizyolojik Önemi	3
2.2. Sınıf I Aldolazlar	7
2.2.1. Sınıf I Fruktoz 1,6 Bisfosfat Aldolazın Protein Yapısı	8
2.2.2. Sınıf I Fruktoz 1,6 Bisfosfat Aldolazın Aktif Merkezi, Kinetik Özellikleri	8
2.2.3. Sınıf I Aldolaz İzozimleri	10
2.3. Sınıf II Aldolazlar	16
2.4. Fruktoz 1,6 Bisfosfat Aldolazın Klinik Önemi	17
2.5. Hamilelik ve Diyabet	18
2.6. Gestasyonel Diyabet (Gestational Diabetes mellitus)	18
2.7. Plasenta	20
3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER	22
3.1. Gereçler	22
3.1.1. Doku Örnekleri ve Kimyasal Bileşikler	22
3.1.2. Aletler	22

3.2. Yöntemler	23
3.2.1. Doku ekstraktının hazırlanması	23
3.2.2. Amonyum sülfat kesitlemesi	23
3.2.2.1. % 45 Amonyum sülfat çöktürmesi	23
3.2.2.2. % 65 Amonyum sülfat çöktürmesi	23
3.2.3. Kromatografik Yöntemler	24
3.2.3.1. Sefadeks G-25 jel filtrasyonu	24
3.2.3.2. Fosfoşelüloz afinite kromatografisi	24
3.2.4. Protein Tayini	
3.2.5. Enzim aktivitesi çalışmaları	24
3.2.5.1. Enzimatik Aktivite Tayini	24
3.2.5.2. Enzim aktivite ölçüm yönteminin optimizasyonu	26
3.2.5.2a. pH optimizasyonu	26
3.2.5.2b. Optimum sıcaklığın saptanması	26
3.2.5.2c. Zaman optimizasyonu	26
3.2.5.3. Kinetik Çalışmalar	26
3.2.6. SDS-PAGE Elektroforezi	27
3.2.7. İstatistiksel Değerlendirmeler	28
4. BULGULAR	
4.1. Aldolaz enziminin saflaştırılması	29
4.1.1. Sefadeks G-25 Kolon Kromatografisi	29
4.1.2. Fosfoşelüloz Afinite Kromatografisi	29
4.2. Elektroforetik İncelemeler	35
4.2.1. SDS-PAGE Elektroforezi	36
4.3. Enzim Aktivitesi Çalışmaları	39
4.3.1. Enzim Aktivite Ölçüm Yönteminin Optimizasyonu	39
4.3.1.1. pH Optimizasyonu	39
4.3.1.2. Optimum Sıcaklığın Saptanması	41
4.3.1.3. Zaman Optimizasyonu	44
4.3.1.3a. İnkübasyon zamanının optimizasyonu	43
4.3.1.3b. Bekleme süresinin optimizasyonu	45

4.3.2. Kinetik alışmalar	46
4.3.2.1. Sağlıklı İnsan Plasental Aldolazının Substrat Kinetiği	46
4.3.2.2. GDM Plasental Aldolazının Substrat Kinetiği	52
4.3.2.3. Sağlıklı İnsan Plasental Aldolazının İnhibitör Kinetiği	56
4.3.2.3a. DHAP kinetiği	56
4.3.2.3b. ATP Kinetiği	57
4.3.2.3c. Mg ⁺² Kinetiği	59
4.3.2.4. GDM Plasental Aldolazının İnhibitör Kinetiği	60
4.3.2.4a. DHAP kinetiği	60
4.3.2.4b. ATP Kinetiği	61
4.3.2.4c. Mg ⁺² Kinetiği	62
5. TARTIşMA	64
6. SONUÇLAR	74
7. KAYNAKLAR	75

KISALTMALAR

FBPA	Fruktoz 1,6-bisfosfat Aldolaz
F 1,6-BP, F 1,6-BP ₂ , FBP	Fruktoz 1,6-bisfosfat
DHAP	Dihidroksi aseton fosfat
GA3-P, GAP	Gliseraldehit 3-fosfat
SI-FBPA	Sınıf I aldolazlar
SII-FBPA	Sınıf II aldolazlar
GDM	Gestasyonel Diyabet (Gestational Diabetes Mellitus)
HFI	Kalıtsal fruktoz intoleransı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1.1	4
Şekil 2.1.2	5
Şekil 2.2.3.1	12
Şekil 2.2.3.2	13
Şekil 2.3.1	17
Şekil 4.1	29
Şekil 4.1.1a	30
Şekil 4.1.1b	31
Şekil 4.1.2a	34
Şekil 4.1.2b	35
Şekil 4.2.1a	37
Şekil 4.2.1b	38
Şekil 4.2.1c	39
Şekil 4.3.1.1a	40
Şekil 4.3.1.1b	41
Şekil 4.3.1.2a	42
Şekil 4.3.1.2b	43
Şekil 4.3.1.3a	44
Şekil 4.3.1.3b	44
Şekil 4.3.1.4a	45
Şekil 4.3.1.4b	46
Şekil 4.3.2.1a	47
Şekil 4.3.2.1b	48
Şekil 4.3.2.1c	48
Şekil 4.3.2.1d	49
Şekil 4.3.2.1e	50

Şekil 4.3.2.1f	51
Şekil 4.3.2.1g	52
Şekil 4.3.2.2a	53
Şekil 4.3.2.2b	53
Şekil 4.3.2.2c	54
Şekil 4.3.2.2d	55
Şekil 4.3.2.2e	56
Şekil 4.3.2.3a	57
Şekil 4.3.2.3b1	58
Şekil 4.3.2.3b2	59
Şekil 4.3.2.3c	60
Şekil 4.3.2.4a	61
Şekil 4.3.2.4b	62
Şekil 4.3.2.4c	63

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablolar	Sayfa
Tablo 2.1.1	7
Tablo 4.1.1	32
Tablo 4.1.2	33

1. GİRİŞ

Fruktoz 1,6-bisfosfat aldolaz (E.C. 4.1.2.13), bir çok doku ve hücrede en önemli glikolitik enzimdir. Fruktoz 1,6-bisfosfat (F 1,6-BP₂) molekülünün, dihidroksi aseton fosfat (DHAP) ve gliseraldehit 3-fosfat (GA3-P)'a yıkılımını geri dönüşümlü olarak katalizler. Bu, enzimatik baz katalizli bir aldol bölünmesi reaksiyonudur (1-6).

Bu reaksiyonun kimyasına göre aldolazlar iki sınıfa ayrılırlar:

Sınıf I aldolazlar; Ökaryotik ve daha gelişmiş organizmalardaki yaygın formudur. Aktiviteleri için katyona gerek yoktur. Monomerlerinin herbiri 40 kDa olan tetramerlerden oluşur. Maksimal katalitik aktivite için mutlak gerekli olan, karboksil terminalindeki tirozin, tüm sınıf I aldolazlarda korunmuştur. Sınıf I Aldolaz'ın her alt birimi aktif merkezlerinde Lizin içerir. Katalitik aktivite boyunca Lizin ile kovalan schiff bazı oluştururlar. Molekül ağırlığı yaklaşık 160.000 Dalton'dur. Memelilerde üç farklı doku spesifik Aldolaz izozimi tanımlanmıştır:

Aldolaz A: Kas dokusunda ve kırmızı kan hücresinde,

Aldolaz B: Karaciğer, böbrek ve ince barsak dokusunda,

Aldolaz C: Beyin ve sinir dokusunda bulunur (1-4).

Bu üç izozim, fiziksel yapıları ve fonksiyonları açısından çok az farklılıklar gösterir. Üçü de, ortak bir genden köken alan, üç farklı gen tarafından kodlanırlar. Her üç izozim de doku spesifik karakter gösterir. Tüm Sınıf I aldolazlarda, yaklaşık 66 tane tamamen korunmuş amino asit dizisi bulunduğu bilinmektedir. Bu enzimler katalitik aktiviteleri ve farklı amino asit dizileriyle birbirinden ayrılırlar.

Sınıf II aldolazlar; Mantar, alg ve prokaryotlardaki formudur. Aktivite için katyona gerek duyarlar. Substrat ile "Schiff bazı" yapmazlar. Aktiviteleri için gerek duydukları iki değerlikli katyonlar genellikle Zn⁺² ya da Fe⁺² dir. İki değerlikli katyon, reaksiyonda substratın karbonil oksijeninin polarizasyonunu sağlar (3-5).

Bir çok enzim için geniş bir kullanım kaynağı olan plasenta dokusu, hem

aldolaz enziminin katalitik özelliklerinin araştırılması açısından, hem de bu dokudan ilk kez saflaştırma yapılması açısından, ayrıca tüm bu parametrelerin sağlıklı ve diyabetli koşullarda çalışılıp, kinetik parametrelerin ilk kez belirleneceği bir kaynak olması nedeniyle uygun görülmüştür.

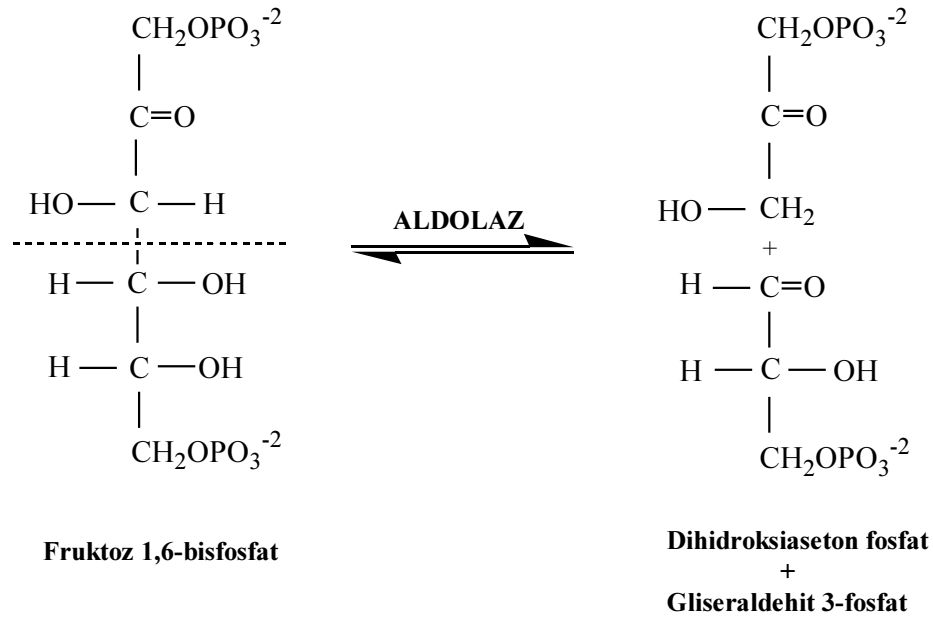
Bu çalışmada, öncelikle plasental aldolazın saflaştırılması amaçlanmıştır. Plasental aldolazın miktarı ve katalitik aktivitesinde diyabete bağlı bir değişiklik olup olmadığının araştırılması çalışmanın bir diğer hedefidir. Bununla birlikte, literatürde bugüne kadar plasenta kaynaklı aldolazın saflaştırılarak katalitik aktivitelerinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmadığından literatüre katkıda bulunması da hedeflenmektedir.

Enzimin biyokimyasal özelliklerinin ayrıntıları ile tanımlanarak, her iki grup arasındaki farklılıkların belirlenip karşılaştırılması ise ileri araştırma parametreleri olarak belirlenmiştir.

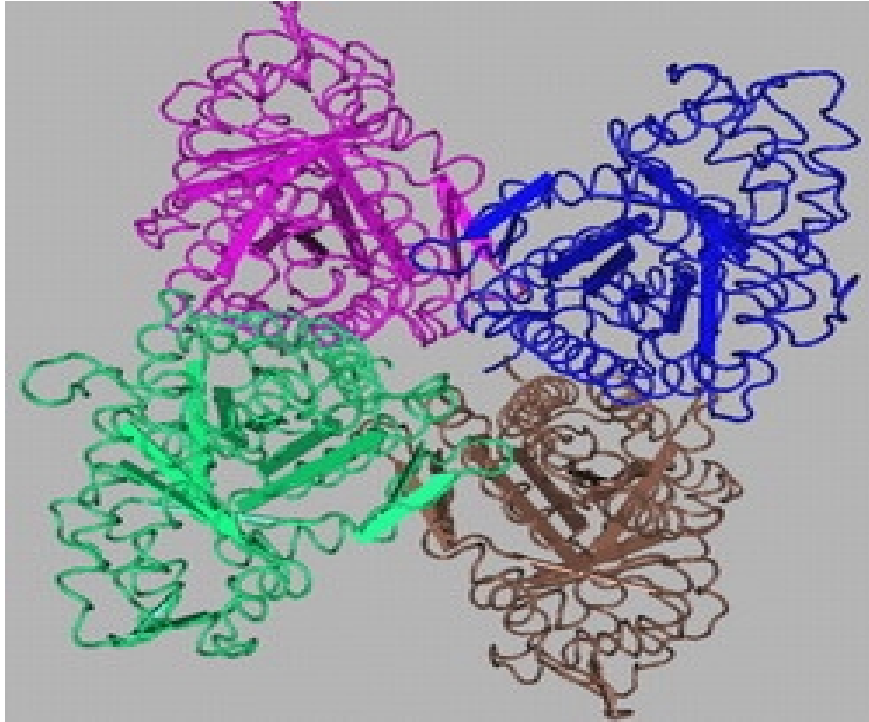
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Fruktoz 1,6-bisfosfat Aldolaz Enziminin Yapısı, Görevi ve Fizyolojik Önemi

Fruktoz 1,6-bisfosfat Aldolaz, (E.C. 4.1.2.13), (FBPA) bir çok dokuda ve hücrede major glikolitik enzimdir. Glikolizin dördüncü basamak reaksiyonu olan Fruktoz 1,6-bisfosfat (F 1,6-BP, F 1,6-BP₂, FBP) molekülünün, dihidroksi aseton fosfat (DHAP) ve gliseraldehit 3-fosfat (GA3-P, GAP)'a dönüşümünü katalizler. Bu reaksiyon, enzimatik baz katalizli bir aldol bölünmesi reaksiyonudur. Aldol bölünmesi; enolat aracılı olup artmış elektron delokalizasyonu ile stabilize edilmektedir (1-3, 5, 6, 10).



Fruktoz 1,6-BP₂ 'ın karbonil grubu, ϵ -NH₂ grubunun Lizin amino asidi ile Schiff-bazı oluşturur. Ardından, C₃-C₄ bağının yarılması ve serbest enzimin rejenerasyonu gerçekleşir. Enzimin her alt ünitesi, katalitik aktivite süresince Schiff-bazı oluşumuna aracılık eden ve Lys amino asidi bulunan aktif bir merkez içermektedir. Alt üniteler, bir β -fiçı tipi yapının α -heliks ve bağlantı döngüsüyle sarmalanmasıyla oluşmaktadır (2, 7, 19).



Şekil 2.1.1: Tavşan kas Aldolaz A'nın Aktif Bölge alt birimleri. Kristal Yapı. Doku, lapin (European rabbit, *Oryctolagus cuniculus*) kasından elde edilmiştir (32).



Şekil 2.1.2: İnsan fruktoz-1,6-bisfosfat aldolaz. Enzimin yapısı, beta tabakaya dikey olarak görüntülenmiştir (41).

Ancak, yapılan son çalışmalarda, hem Schiff-bazı oluşumu hem de C_3-C_4 bağının yarılmasında temel oluşturduğu düşünülen amino asitlerin tamamı, henüz tam olarak belirlenememiştir. Zincirin açılmasını, substratın karbonil grubundaki lizin amino asidine yapılan ve kovalan karbinol amin aracı oluşumuna yol açan nükleofilik bir atak izler. Daha sonra, karbinol amine proton verilmesini takiben, dehidrasyon aracılığı ile Schiff-bazı oluşur. Başka bir proton, 4'-hidroksil'den salınarak, C_3-C_4 bağının yarılmasına yol açar ve ürün olarak GAP açığa çıkar. Ancak hala, hangi amino asidin Schiff bazı oluşumunda, hangisinin ya da hangilerinin C_3-C_4 bağının yarılmasında temel oluşturduğu tam olarak bilinmemektedir. Bununla birlikte, kristallografi çalışmaları sonucunda, Schiff-bazı oluşumunun, Glu187'nin aracılık ettiği düşünülmektedir. Ayrıca, daha önce, esansiyel katalitik amino asit olarak belirlenen Asp33'ün C_3-C_4 bağının yarılmasında temel oluşturduğu da ileri sürülmektedir (42).

Sentetik kimyada, aldolazın kimyasal aksiyonu, bu reaksiyonların stereokimyası aracılığı ile sıkı kontrol edilmektedir. Böylece, günümüzde artık bu

enzimler, sentetik organik kimyada, biyotransformasyon çalışmalarında ve özellikle yeni antibiyotiklerin sentezinde, geleneksel kimyasal yöntemlere alternatif olarak sıklıkla kullanılmaktadır (11).

Enolat stabilizasyonunun kimyasına göre iki sınıf aldolaz vardır:

I) Sınıf I aldolazlar (SI-FBPA'lar)

II) Sınıf II aldolazlar (SII-FBPA'lar)

Sınıf I Aldolazlar, ökaryotlardaki özellikle hayvanlardaki ve yüksek bitkilerdeki formudur. Enzim substratıyla Schiff-bazı oluşturur ve aktivitesi için divalan (iki değerlikli) iyon gerektirmez.

Sınıf II aldolazlar, çoğunlukla prokaryotlardaki enzim formudur ve aktiviteleri için iki değerlikli iyonlara gereksinimleri vardır.

SI-FBPA ve SII-FBPA'ların DNA'larının gen dizilimleri arasında herhangi bir homoloji bulunmamaktadır. Buna göre, her iki FBPA sınıfının birbirinden bağımsız olarak evrimleştikleri ve genetik açıdan akraba olmadıkları öne sürülmektedir (4, 42, 44).

Tablo 2.1.1: SI-FBPA ve SII-FBPA’ların Yapısal ve Katalitik Özellikleri (4)

Özellik	Sınıf I Aldolazlar	Sınıf II Aldolazlar
	(Tavşan Ald. A)	(Halobacterium mediterranei)
Alt birim (kDa)	40	80
“Native” Yapı	Homotetramer (160)	Homodimer (160)
Metal iyon bağlanması	Yok	Fe ⁺²
“Schiff-baz” oluşumu	Var	Yok
FBP için Optimum pH	6.9-8.8	7.2

2.2. Sınıf I Aldolazlar

Bu gruptakiler, ökaryotik ve daha gelişmiş organizmalardaki yaygın formudur. Bitki, protozoa, böcekler ve memelilerle yapılmış karşılaştırmalı amino asit sekans çalışmaları, sınıf I ökaryotik aldolazların primer yapısının evrim boyunca yüksek oranda korunduğunu göstermektedir (2, 4, 8-11). Sınıf I aldolazların aktiviteleri için katyona gerek yoktur. Monomerlerinin her biri 40 kDa olan tetramerlerden oluşur. Molekül ağırlığı yaklaşık 160 kDa olan homotetramerlerdir. Karboksil terminalindeki tirozin amino asiti maksimal katalitik aktivite için mutlak gereklidir (1, 2, 4-6, 8, 9, 11). Yapısal olarak SI-FBPA’lar, homotetramerik, (α/β)₈ fiçi (barrel) yapıdadırlar (42).

2.2.1. Sınıf I Fruktoz 1,6 Bisfosfat Aldolazın Protein Yapısı

Sınıf I aldolazların her alt birimi aktif merkezlerinde Lizin (Lys) amino asidi içerir. Katalitik aktivite boyunca Lizin ile kovalan Schiff bazı oluştururlar. Schiff bazı oluşumunu sağlayan Lys'in yan zinciri (insan tip-I aldolazda Lys-229), sekiz ilmekli β -fiçı yapısının merkezine doğru lokalize olmuştur (1-4). Substrat bağlama bölgesinin etrafını saran amino asitler dört gruba ayrılırlar:

1. Grup: Bu gruptakiler, protonların ayrılmasını ve kazanılmasını sağlarlar.
2. Grup: C-1 Fosfat ile iletişimde olan amino asitlerdir.
3. Grup: Bu gruptaki amino asitler, C-6 Fosfat ile iletişimde olanlardır.
4. Grup: Aktif bölge çevresinde nötral elektrostatik potansiyelin oluşumuna yardımcı olan asidik amino asitlerdir.

2.2.2. Sınıf I Fruktoz 1,6 Bisfosfat Aldolazın Aktif Merkez Yapısı ve Kinetik Özellikleri

Aldolazın katalitik mekanizması için ilk kez 1974 (49) yılında verilen model, günümüze dek enzimin üç boyutlu yapısının analizi, izozimlerin primer yapılarının karşılaştırılması ve "site-direct mutagenesis" çalışmaları ile oldukça geliştirilmiştir.

Fruktoz 1,6 BP 'ın karbonil grubu, enzimin lizin amino asidinin, ϵ -NH₂ grubu ile " Schiff bazı" oluşturur. Lys'nin çevresinin yüksüz bir amino grubu içerdiği düşünülmektedir. Hem yapısal hem de kimyasal bilgiler, karbinol amininin, Schiff bazı oluşturan Lys amino asidinin C-2 karbonuna bağlı oksijene bir proton transferi sonucu oluştuğunu göstermektedir (1, 2, 4). Aktif bölgedeki reaktif Lys, halkasal FBP yani substratın ketoz kısmına saldırır. Dipolar tetrahedral karbinol aminin keto fonksiyonlarıyla,

1. Nötral karbinol amin türlerinin açığa çıkması,
2. Trigonal Schiff bazının, protonlanmış imin formunun oluşumu,
3. C₃-C₄ bağının kırılması ve enamin formasyonunun oluşması,
4. Nihayetinde, aktif bölgenin aktif formunun oluşumu (46) sağlanır.

Enzimin;

- ◆ 1-Fosfat bağlama bölgesi Arjinin 148 ve Lizin 146'dır.
- ◆ 6-Fosfat bağlama bölgesi Lizin 41 ve Arjinin 42 ile oluşturulur.
- ◆ Aktif bölge etrafında çok sayıda asidik ve bazik gruplar vardır.
- ◆ Esansiyel C terminal Tirozin, Lizin ile Schiff bazı oluşturur (1-3).

Zincirdeki 345 ve 353 arasındaki amino asitler genellikle küçük ve alifatiktirler. İlk dokuz amino asit esnek bir ilmik oluşturarak, enzim yüzeyini Heliks H₂'nin karboksil ucundan, Heliks G'nin amino ucuna dek sarar. Bu noktada, korunmuş olan Ser-355'nin yan zinciri, heliksin sonundaki azot atomuyla bir hidrojen bağı yapar. Bu etkileşim, enzime özgü sekiz iplikli α/β motifini oluşturmak üzere karboksi terminalinin son bölümünde lokalize olur (1).



Yukarıda E-S kompleksinin şematik görünümü verilmiştir. Burada da görüldüğü gibi, E=Fru-1,6-P₂, hız sabiti k₁ olan ve Schiff-baz geçiş formunu oluşturan ara formdur. Ürünlerin oluşum hızı ise, k₂ hız sabiti ile ifade edilmektedir. İlki, Schiff-bazın oluşumunun, ikincisi ise, C-C bağ kırılmasının ve iki mol üç karbonlu ürünün oluşumunun hız sabitleridir. E-Fru-1,6-P₂ kompleksinin, yani, aldolaz'a hegzozun bağlanması ve geçiş formu olan Schiff-bazının oluşumunu ifade

eden yapı, aktif bölgenin farklı noktalarında görülebilir. Bununla birlikte, aktif bölge amino asitlerinin yerleşimi, bu hemi-ketal kırılımından sorumludurlar. Ancak gene de, tam anlamıyla bu mekanizma çözülememiştir (53).

2.2.3. Sınıf I Aldolaz İzozimleri

Memelilerde üç farklı doku spesifik Aldolaz izozimi tanımlanmıştır:

Aldolaz A: Kas dokusunda ve kırmızı kan hücresinde,

Aldolaz B: Karaciğer, böbrek ve ince barsak dokusunda,

Aldolaz C: Beyin ve sinir dokusunda bulunur.

Bu üç izozim, tek ortak ata genden gelen, üç farklı gen tarafından kodlanırlar. Tüm aldolazlarda, yaklaşık 66 tane tamamen korunmuş amino asit dizisi bulunduğu bilinmektedir. Her üç izozim doku spesifik karakter gösterirler. Bu üç izozim fiziksel yapıları ve fonksiyonları açısından çok az farklılıklar gösterirler. Dokudan saflaştırma yöntemlerinde de farklılık görülmemektedir. Ancak, katalitik aktiviteleri ve farklı amino asit dizileriyle ayrılırlar (1, 2, 9, 46). Bu üç izozim yalnızca katalitik özellikleriyle değil, elektroforetik, kromatografik ve immünolojik özellikleriyle de farklılıklar gösterirler (1, 4, 50).

Aldolaz A, glikolizde Fruktoz 1,6-bisfosfatın, gliserol 3-fosfat ile dihidroksiaseton fosfata yıkılımını katalizler. Aldolaz A memeli dokularında, embriyonik formdur. Yetişkin organizmalarda ise özellikle kasda yüksek miktarlarda bulunur. Bu izozim, Fruktoz 1,6 bisfosfata, Fruktoz -1-fosfat'dan yaklaşık 20-25 kat daha fazla afinite gösterir ve özellikle glikolizde görev alır.

Aldolaz A genindeki mutasyonların neden olduğu hastalıkların araştırılması sonucu, enzimin önemli rolleri aydınlatılmıştır. Bunlardan hemolitik anemiye neden

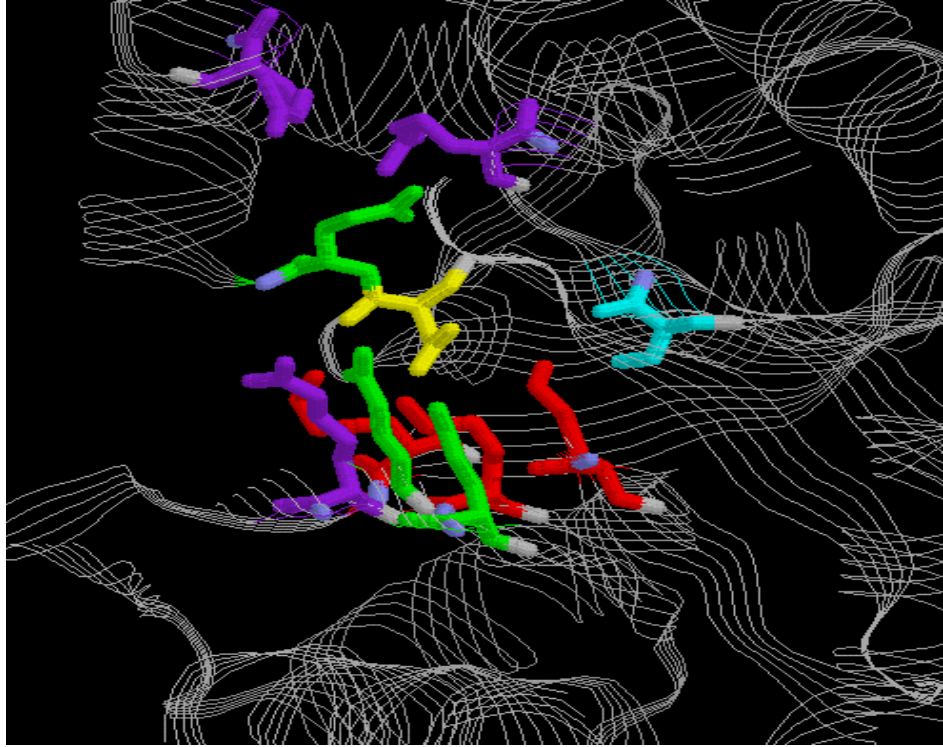
olan mutasyon, alt birimler arası etkileşimin olduğu bölgede amino asit substitüsyonuna yol açarak, enzimin oligomerik yapısının destabilizasyonuna neden olur. Bu aldolaz dimerleri için çok düşük aktivite kayıpları bulunmuştur. Böylece, aneminin aktivite kaybına değil, aldolazın stabilitesindeki kayba bağlı olduğu anlaşılmıştır (15-18).

Aldolaz A eksikliği, otozomal resesif bir hastalıktır. Bu izozimin eksikliği oldukça nadirdir. Aldolaz A genindeki Asn128→Gly ve Glu206→Lys değişimiyle ortaya çıkan ve sonucunda hemolitik anemi ve miyopatik semptomların görüldüğü bir durumdur. Son yapılan bir çalışmada ayrıca, Gly346→Ser mutasyonu da olduğu gösterilmiştir (48).

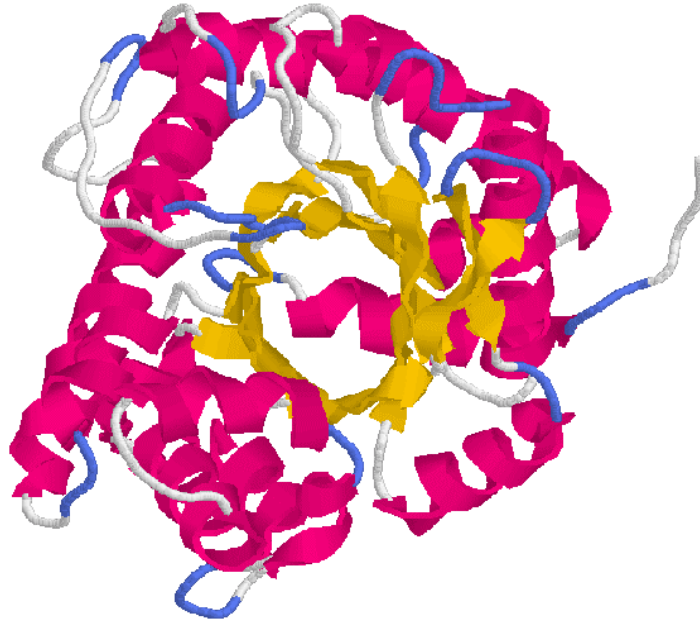
Tavşan kası aldolazı, üzerinde en çok çalışılarak ayrıntıları ile karakterize edilen sınıf I aldolazdır. Bu enzim, amino asit dizisi aydınlatılmış ilk aldolaz olması bakımından önemlidir. cDNA klonlaması sonucu tavşan kası aldolaz A enziminin 363 aminoasit içerdiği gösterilmiştir (17, 20, 21). Aldolaz A, aldolaz ailesinin, üzerinde en çok çalışılmış izozimi olmasına karşın, katalitik aktivite mekanizması henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Aktif bölgedeki amino asitler ve rolleri hala çok açık değildir (20).

İnsan ve tavşan aldolaz A'nın üçüncül ve dördüncül yapıları, karşılaştırmalı X-ışını kristalografisi çalışmaları sonucu yapıldığında, her ikisinin de son derece benzer yapılar içerdikleri ortaya çıkmaktadır. Her ikisinde de polipeptidin karboksil terminal ucunun hareketli olduğu ve aktif bölgeye girip çıkabildiği varsayılmaktadır (21).

İnsan aldolaz A geninde oluşan doğal bir mutasyon sonucunda "hemolitik anemi" oluşmaktadır. Mutant enzim doğal kuarterner yapısını kaybetmiştir ve daha az stabildir. Mutant form, doğal forma oranla özellikle termal stabilitesini kaybetmiştir. Monomerik yapıların, multimerik formlarını kazanmalarında sıcaklığın çok önemli olması sonucudur ki, kuarterner yapı, mutant aldolazda son derece labildir (17-20).



Şekil 2.2.3.1: Tavşan Kas Aldolaz A'nın aktif bölgesindeki aa'ler. Kristal yapı β -fiçı (Barrel) yapısına dikey olarak görüntülenmiştir. Lys: kırmızı, Asp: sarı, Glu: yeşil, Arg: mor, Ser: mavi (45).



Şekil 2.2.3.2: İnsan (*Homo sapiens*) kas Aldolaz A (51).

Aldolaz B, fruktoz metabolizması ve glukoneogenezde fonksiyon gören ve en fazla karaciğerde bulunan aldolaz izozimidir (1-3,5). Karaciğer aldolaz izozimi olan aldolaz B, fruktoz 1-fosfat yıkılımı ve fruktoz 1,6-bisfosfat sentezi için büyük bir katalitik etkinliğe sahiptir. Fruktoz 1-fosfat, Aldolaz B ile D-gliseraldehid ve Dihidroksiaseton fosfata yıkılır. İnsan aldolaz B'nin kristalografik yapısı tam olarak bilinmemesine karşın, aldolaz izozimlerinin amino asit dizisi benzerlikleri nedeniyle, diğer izozimlerin de tavşan aldolaz A'ya yapı benzerliği gösterdiği tahmin edilmektedir (4-6, 13, 14, 24, 25, 32).

İnsan aldolaz B genindeki mutasyonlar, aldolaz B aktivitesinde azalmaya neden olarak, otozomal resesif bir hastalık olan “Kalıtsal fruktoz intoleransı” na (HFI, Hereditary fructose intolerance) yol açar. Ancak, aldolaz B üzerindeki mutasyonların yapıyı mı yoksa aktiviteyi mi etkilediği hala araştırılmaktadır (15, 16, 32, 43).

Aldolaz B geninin ekspresyonunun kontrol mekanizması, tam olarak anlaşılamamıştır. Aldolaz B geninin transkripsiyonu, glukoz ve insülin tarafından kendiliğinden stimüle edilir (Fruktozla beslenen ratlarda, mRNA düzeylerinin arttığı

kanıtlanmıştır.). Aldolaz B genindeki promotor bölgenin, transkripsiyon başlangıcından 5' yönünde (200 baz çiftlik), çok sayıda karaciğer spesifik cis-elementlerini (HNF-1 ve HNF-2) içerdiği bilinmektedir (47).

İnsan Ald B, Ald. A ile % 70 oranında sekans benzerliği gösterir. Ala149 β -strand üzerinde, substrat bağlama bölgesindeki proteinin yüzeyinde yer alır. Ala149, tüm aldolaz B'ler için izozim spesifik amino asittir. Aldolaz A ve C'de bu konumda Cys aa bulunur. Aldolaz B'deki bu amino asid, α -heliks bölgesinde yerleşik olup substrat bağlama bölgesiyle bağlantısı olduğu düşünülmektedir. Aynı zamanda, bu bölgede oluşan çok şiddetli mutasyonlar sonucu, Ala \rightarrow Pro149 ve Ala \rightarrow Pro174 değişimi ile bu domain'in grift yapısının bozulmasına ve dolayısıyla proteinin aktivitesinin kaybına neden olduğu da varsayılmaktadır. Günümüzde, sınıf I aldolazların karboksil terminal uçlarının uzaysal konfigürasyonları tam anlamıyla çözülememiş olmasına karşın, aldolazın fonksiyonları için önemli olan amino asitlerin bu bölgede korunduğu açıktır. Bu nedenle, HFI hastalarındaki 334. konumdaki Asp \rightarrow Lys ve Ala \rightarrow Val 337. değişimleri, enzim aktivitesi açısından önemlidir (43).

Kalıtsal Fruktoz İntoleransı (HFI);

İnsan aldolaz B izozimi, özellikle fruktoz metabolizması ve glukoneogenezde fonksiyon görmektedir. Aldolaz B genindeki mutasyonlar, aldolaz B aktivitesinde azalmaya neden olarak, otozomal resesif bir hastalık olan "Kalıtsal fruktoz intoleransı" na yol açar.

HFI, aldolaz B'nin yer aldığı dokularda, enzimin mutasyon geçirip aktivitesinin azalması ve buna bağlı olarak, Fruktoz-1-Fosfat düzeyinin aşırı artışıyla açığa çıkan zararlı metabolik etkiler sonucu, özellikle karaciğer ve böbrekte doku hasarlarına neden olur. HFI hastalarında enzim miktarının değil, enzimin katalitik aktivitesinin azaldığı belirtilmektedir.

Karın ağrısı, kusma ve hipoglisemi, hastalığın belirgin semptomları arasındadır. Zamanında tanı konmayıp, fruktozla beslenmeye devam edilen ve tedavi görmeyen bebeklerde; gelişme geriliği, renal tübüler disfonksiyonu, karaciğer yetmezliği, koma ve sonunda ölüm görülmektedir. Ancak, sıkı bir diyet uygulanan ve

fruktoz alımı tamamen yasaklanan hastaların normal yaşamlarını sürdürdükleri bilinmektedir.

Yaygın HFI alleli olan A149P'dir (149. pozisyonda alanin-prolin süstitüsüyonu). AP-aldolazı, dünyadaki HFI allel'lerinin %57'sini oluşturur. Yani, HFI hastalarının, bu mutant genin en azından bir kopyasını taşıma şansları % 82'dir. HFI hastalarının bazılarının genotipleri, A149P için homozigot olarak saptanmıştır (47).

Aldolaz C, Aldolaz A izozimine benzer kinetik özelliklere sahiptir. Ancak bu enzimin beyindeki spesifik fizyolojik rolü net olarak bilinmemektedir. Aldolaz C'nin heksokinaz-I ve laktat dehidrogenaz-H gibi diğer izozimlerde olduğu gibi, dokuda metabolik aktivitenin değişmez bir parçası olduğu düşünülmektedir. Aynı zamanda, bu tür enzimlerin temel yapısal karakteristiklerinde spesifik bir enzim-enzim etkileşimi olduğu da düşünülmektedir. Aldolaz C, A ve B izozimlerinin arasında bir katalitik aktivite gösterir.

Aldolaz C'nin, beyinde S-100 proteini ve zebrin II antijenine bağlı olarak bulunduğu bilinmektedir (12, 40). Son zamanlarda aldolaz C izozimi, trakeal düz kaslarında inozitol trifosfat bağlayıcı protein olarak da tanımlanmıştır. Karşılaştırmalı analizler sonucu, C izoziminin beş spesifik amino asidinden dördünün: Arg-314, Thr-324, Glu-332 ve Gly-350, enzimin karboksil terminal bölgesinde lokalize oldukları belirlenmiştir. Diğer amino asit olan Leu-57, proteinin ikinci alfa heliksinin içine doğru uzanmaktadır (12).

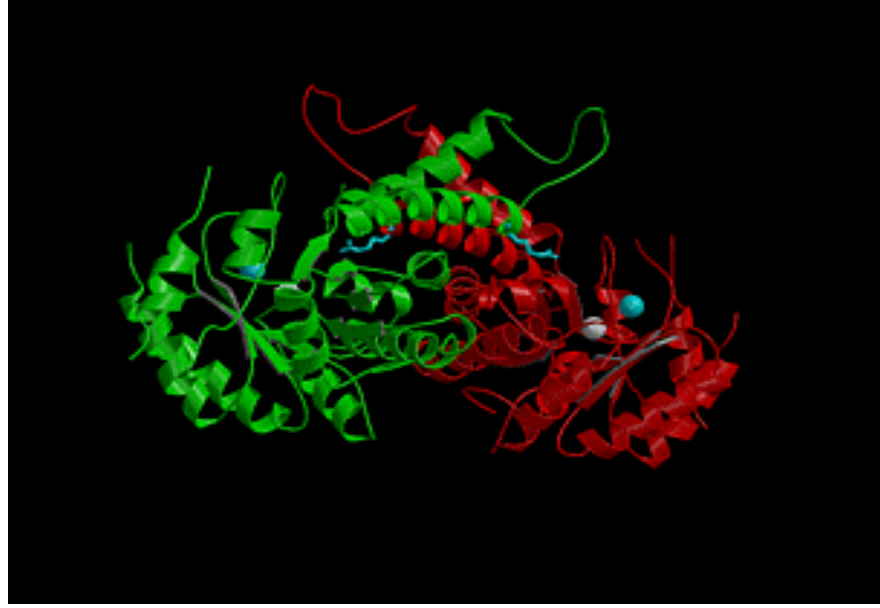
Aldolaz A ve C'nin amino asit ve nükleotid dizilerinin karşılaştırılması ile, her iki izozimin, B'ye oranla, birbirlerine daha çok benzer oldukları gösterilmiştir. Ancak, aldolaz A ve C arasındaki kinetik farklılıkların nedenleri henüz kesin olarak anlaşılammıştır. Yapısal minor farklılıkların, örneğin, aldolaz A'nın aktin bağlama özelliğinin ya da aldolaz C'nin S-100 protein bağlama özelliğinin, supramoleküler ilişkide her izozim için esansiyel olabileceği düşünülmektedir (6, 7, 16-18, 27).

2.3. Sınıf II Aldolazlar

Birçok bakteri, mantar, alg ve diğer prokaryotlardaki formudur. Sınıf II aldolazların evrimsel olarak sınıf I aldolazlara göre daha ilkel olduğu düşünülmektedir. İlk kez 1964'de ortaya atılan bu görüşten farklı bir bilgi henüz elde edilmemiştir (22). Sınıf I aldolazlar sadece ökaryotlarda (alg, protozoalar, bitkiler ve hayvanlar) bulunurken, sınıf II aldolazlar prokaryotik canlılarda (bakteri, mavi-yeşil algler) ve ökaryotik maya ve mantarlarda bulunmaktadır.

Sınıf II aldolazlar sıklıkla homodimerik yapıya sahiptirler ve aktiviteleri için iki değerlikli bir katyona gerek duyarlar. Sınıf I aldolazlardaki gibi substrat ile schiff bazı yapmazlar. Stabilite ve aktiviteleri için tiol gruplarını gerek duymazlar (52). Aktiviteleri için gerek duydukları iki değerlikli katyonlar genellikle Zn^{+2} ya da Fe^{+2} dir. Ayrıca, Co^{+2} , Ni^{+2} ve Mn^{+2} da aktif bölgede yer alan divalen iyonlardandır. İki değerlikli katyon, aktif merkezde metallo-protein kompleksini oluşturarak, reaksiyonda substratın karbonil oksijeninin polarizasyonunu sağlar (1, 2, 11, 52). Bu divalen katyon, varolan ketozların karbonil bağlarının polarizasyonunu sağlayan "Lewis asidi" olarak fonksiyon yapar. Böylece, enamin formasyonu oluşumu sırasında proton transferi gibi, birbirine komşu karbon bağlarının yıkılımı sağlanmış olur (11). Sınıf II aldolazlar arasında, çok fazla göze çarpmayan kiral bir ayırım söz konusudur. Aktif bölge etkileşiminde ve substratla bağlantı noktalarında, tanıma ve substratına bağlanma durumlarında farklılıklar olduğu düşünülmektedir (11).

Sınıf II aldolazlar, NH_4^+ gibi monovalan katyonlarla aktive edilirler. Bunlar, sınıf I aldolazlara göre çok daha yüksek bir substrat spesifitesi gösterirler ki bu nedenle, biotransformasyon kimyası çalışmalarında çok daha fazla tercih edilmektedirler. Sınıf II aldolazlar, antibakteriyel ve antifungal ilaç etkileşimlerinde önemli hedefler oldukları için, ilaç gelişimi çalışmalarında büyük öneme sahiptirler. Çünkü, bu sınıf aldolazlar oldukça geniş oranda prokaryotlar, maya ve daha alt sınıf ökaryotlar sınıfına dahildirler. Antibakteriyel ve antifungal ilaçlar için potansiyel hedefler olarak da kullanılmaya başlandığından bu yana, aralarındaki önemsiz gibi görünen farklılıkların, aslında yapı değişikliklerini ve dolayısıyla aktiviteyi ne yönde etkilediği de aydınlatılmaya başlamıştır (11).



Şekil 2.3.1: E. Coli'den elde edilen Sınıf II Aldolaz'ın kristal yapısı (Dr. W. N. Hunter Üniversitesi, Dundee).

2.4. Fruktoz 1,6 Bis-Fosfat Aldolaz'ın Klinik Önemi

Özellikle kas hastalıklarında, kanda Aldolaz düzeyleri artar. Müsküler distrofide olduğu gibi, herhangi bir kas hastalığında ya da kas zedelenmelerinde, hücreler zorlanarak bozulur ve hücre içeriği kan dolaşımına katılır. Kanda aldolaz miktarını ölçmek, kas hasarının miktarını gösterir. Kas hasarı, daha da kötüye giderse, aldolaz düzeyleri düşer ve en sonunda normalin altına iner. Ancak, kas zayıflığı, nörolojik bir rahatsızlıktan kaynaklanıyorsa, aldolaz düzeyleri normal kalır.

Aldolaz aynı zamanda karaciğer ve kalp kasında da bulunduğu için, bu organlardaki herhangi bir hasar sonucunda da, kanda aldolaz düzeyleri artar.

İncinme, gangren ve herhangi bir enfeksiyonda aldolaz düzeyleri artar. Viral hepatit ve miyokard enfarktüsünde serum aldolaz düzeyi artar. Tıkanma sarılığı, kronik hepatit, müsküler distrofi, yanık hasarı ve akut pankreatitte ise artma daha az düzeydedir. Aldolaz izozimlerinde doğal mutasyonların oluşmasının, insanda "Hemolitik anemi formlarına" ve "Kalıtsal fruktoz intoleransına" neden olduğu bilinmektedir (23-26).

2.5. Hamilelik ve Diyabet

Diyabetik komplikasyonlarda plasental fonksiyonlarda, özellikle glukozun alımında, transferinde, kullanımında, aynı zamanda glikolizde, glikolitik enzimlerin düzeyleri ve aktivitelerinde farklılıklar vardır. Placenta, maternal diyabetik koşullara karşı fetüsün korunmasında önemli rol oynamaktadır.

Fetüs kan glukoz düzeyi, anne kan glukoz düzeyi ile ilişkilidir. Diyabetli anne çocuklarında görülen bir çok bozukluklar, anneden bazı substratların placenta yoluyla çocuğa geçişiyle açıklanabilmektedir. Maternal diyabetik durumun yarattığı patolojik metabolik ortam, fetüsü önemli ölçüde etkiler. Bu durum fetüs pankreasının β – hücrelerinin uyarılmasına ve fazla insülin salgılanmasına yol açar (24, 28, 29).

2.6. Gestasyonel Diyabet

Gestasyonel Diyabet (Gestational Diabetes Mellitus, GDM), hamilelik boyunca ortaya çıkan karbohidrat intoleransı olarak tanımlanmaktadır (28, 38). GDM, farklı bir hiperglisemidir. Hiperglisemi genellikle, insülin eksikliği ve buna bağlı olarak, dokuların normal glukoz düzeylerinin sağlanmasında yetersizlikle sonuçlanır (38).

GDM'un hamilelerde görülme sıklığı yaklaşık % 3-5'tir. Obezite, önceki hamileliklerdeki fetal ölüm, 40 yaş ve üstü hamilelikler, ailesel diyabet hikayesi, makrozomi, konjenital malformasyon ve aşırı kilo alımı GDM için risk faktörleridir (28-31).

Annenin glukoz düzeylerindeki artış, fetus açısından büyük önem taşır. Yüzyıldan fazla bir süredir, diyabetin gerek fetüsde ve gerekse annede çok sayıda ciddi hasarlara yol açtığı bilinmektedir. Maternal glisemik eşğin aşılması ve glukoz düzeylerinin kontrol dışı kalması, fetal morbidite ve mortalite risklerini oldukça arttırmaktadır (38). Fetus, placenta yoluyla anneden aldığı glukoz, amino asit ve yağ asitleri ile beslenir. Annenin kanında yükselen glukoz miktarı, direkt olarak fetusa

yansır ve fetusta glukoz fazlalığı oluşur. Bebek bu duruma yaptığı insülini artırarak cevap verir. İnsülin bebekte büyümeyi uyaran bir hormondur. Fetal insülinin gebeliğin 24. ile 28. haftalarından itibaren artışı, bebeğin büyümesini hızlandırır ve doğum ağırlığı 4.000 g'ın üzerine çıkar. Makrozomi olarak adlandırılan bu tablo bebek açısından pek çok risk taşır (28, 29). GDM'li annelerin fetüsleri için oldukça yüksek perinatal morbidite ve mortalite riski vardır. GDM'li annelerin fetüslerinde perinatal komplikasyonlar gelişir (39).

Hem progestasyonel hem de gestasyonel diyabette fetal ölüm, prematüre doğum, doğum travmaları, “neonatal respiratory distress sendromu”, hipoglisemi, hiperbilirubinemi, hipokalsemi, hipomagnezemi ve kardiyomyopati ile birlikte gözlemlenen neonatal patolojilere sıklıkla rastlanmaktadır (30, 31).

Yapılan son çalışmalarda; gestasyonel diyabetlilerde (GDM) maternal ortamdaki D-glukozun alımı, fetal dolaşıma transferi, plasentada D-glukozun kullanımı ve laktatın üretiminin azaldığı, kontrollerle karşılaştırılarak kanıtlanmıştır. GDM plasentadaki glukoz metabolizmasının da kontrol plasentalarla karşılaştırıldığında yavaşladığı belirtilmektedir. GDM'da laktatın maternal ve fetal dolaşıma bırakılması da azalmaktadır (30, 31).

Diyabetik hamilelerde utero-plasental kan akımının % 35-45 oranında azaldığı kaydedilmiştir. Bu durumun azalmış ya da kaybedilmiş intravillöz yüzeye bağlı olarak ortaya çıktığı kanıtlanmıştır (29-31).

Tüm bu verilere karşın, diyabetin plasental fonksiyon üzerindeki etkileri tam ve yeterince açıklanmış değildir..

Hiperinsülinemi ve substrat (glukoz) fazlalığı sonucu, ayrıca fetüs hücrelerinde insüline afinitesi olan reseptör sayısının da erişkine oranla fazla olması sonucu fetüste glikojen, yağ ve protein yapımı belirgin olarak artar. Fetal hiperinsülinizm ve annedeki diyabetin fetuse yansması ile diyabetik annenin çocuğunda; hipoglisemi, hipokalsemi, hiyalin membran hastalığı, hiperbilirubinemi, prematürelilik, renal ven trombozu, konjenital anomaliler, kardiyomyopati gibi önemli patolojik durumlar gelişebilmektedir (29-31).

2.7. Plasenta

Plasentanın fiziksel yapısı, anne ve yeni doğan için önemli ipuçları verebilir. Normal bir plasenta yaklaşık 22 cm boyunda ve 2x2,5 cm kalınlığında ve 500 g. ağırlığındadır. Ancak bu rakamlar son derece değişken olup, annenin ve bebeğin çok sağlıklı koşullarda olduğunda geçerli sayılabilir. Plasentanın maternal yüzeyi, koyu kırmızı-kestane renginde ve loblu; fetal yüzeyi, parlak, pürüzsüz ve gri renkte olmalıdır. 4 cm'den kalın plasentalar, maternal diyabet olasılığını akla getirir.

Plasenta bebek ile anne arasındaki besin ve oksijen transferini sağlayan gebeliğin devamı açısından hayati bir organdır. Anne ile fetus arasında besin ve hava transferini sağlar. Hamilelik için yaşamsal olan hormonları üretmek suretiyle, metabolik endokrin işlevler de görür. Fetusün gelişimi için olduğu kadar, hamilelik süresince anneye de gereken steroid ve protein hormonların üretiminde önemli rol oynar. Bunlar; Progesteron, östrojen, plasental laktojen, büyüme hormonu (hGHV), koryonik gonadotropin, hipotalamik faktörlere benzer plasental peptidlerdir. Bu hormonlar, foliküler gelişimi ve ovulasyonu baskırlar. Aynı zamanda, anne bedenine yabancı olan fetüse cevap olarak uterusun kasılarak fetüsü atmasını da engeller. Bununla birlikte, annede yağ ve protein mobilizasyonunu artırarak, meme bezlerinde süt oluşumuna hazırlık sağlarlar.

Bunlarla birlikte plasenta;

Maternal ve fetal döngülerin ayrımını korur, fetüsü besler, fetal artıkları uzaklaştırır. Döllenmiş ovumun korunmasını ve gelişimini sağlar (29-31, 33). Embriyoya karşı anne vücudunun oluşturabileceği immünolojik yanıtı karşı, anneyle embriyo arasında bariyer görevi görür.

Plasental hücrelerde Glikolitik yol, Pentoz fosfat yolu, Krebs döngüsü ve elektron taşıyıcı sistemler aktif olarak çalışmaktadır.

Plasenta dokusunun metabolik hızı erişkin karaciğer ve böbrektekine eşdeğerdir (29-31, 33).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Gereçler

3.1.1. Doku Örnekleri ve Kimyasallar Bileşikler

Plasenta dokusu, doğumun hemen ardından Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Doğum Kliniği'nden sağlandı. Dokular hem sağlıklı ve hem de gestasyonel diyabetli annelerden alındı.

Tavşan kası aldolazı ve D-fructose 1,6 BP, Sigma, ABD'den, Amonyum sülfat ((NH₄)₂SO₄), sodyum hidroksit (NaOH), n-butanol (CH₃(CH₂)₃OH), asetik asit (CH₃COOH), Merck, Almanya'dan; sığır serum albumini, mutlak etanol (C₂H₅OH), hidroklorik asit (HCl), British Drug Houses Ltd., İngiltere'den; "Coomassie Brilliant Blue" G-250 Serva Almanya'dan, Trietanolamin (TEA), Hidrazin sülfat , Trikloroasetik asit (TCA), Dinitrofenilhidrazin (DNPH), Fruktoz 1,6 bisfosfat (FBP₂), Sefadeks G-25, Pharmacia'dan sağlandı.

3.1.2. Aletler

Santrifügasyon için, Sorwal RC-5B marka soğutmalı ultrasantrifüjü; homojenizasyon için teflon başlıklı homojenizatör; pH ölçümlerinde Orion 420 (ABD) pH metre cihazı; manyetik karıştırıcı olarak IKAMAG; saflaştırmada Isco peristaltik pompası ile Isco fraksiyon kollektörü; enzim aktivite, protein tayinleri ve A₂₈₀ taramaları için, Shimadzu UV-1601 UV-Visible marka spektrofotometre; inkübasyon ortamı için Nüve BM 402 marka sıcak su banyosu; elektroforetik incelemelerde Mini protean II Biorad sistemi (ABD) elektroforez cihazı; görüntüleme Fujifilm Fine-Pix S602 Zoom dijital kamerası; tartımda Mettler hassas terazisi kullanıldı.

3.2. Yöntemler

3.2.1. Doku ekstraktının hazırlanması

Taze plasenta, buz içinde laboratuvara getirilerek 50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 4mM β-merkaptolanol tamponunda (pH 7,5) +4 °C'de soğutuldu. Plasentalar, tampon ve serum fizyolojik ile yıkanarak amniyotik zar ve bağ

dokusundan tamamen temizlendi.

Plasenta iyice temizlendikten sonra, kaba doku tartıldı. Aynı tamponla, önce mikserle parçalandı; sonra teflon başlıklı homojenizatörle (3 v/w) homojenize edildi.

Homojenatın miktarı ölçülüp, 14.000xg'de 1 saat, +4 °C'de santrifüj edildi. Berrak süpernatanın miktarı ölçüldü; protein (36) ve aktivite tayini (35) yapıldı.

3.2.2. Amonyum sülfat çöktürmesi

3.2.2.1. % 45 Amonyum sülfat çöktürmesi

Berrak süpernatanın her 100 ml'si için 26.2 g amonyum sülfat eklendi. 1 saat +4 °C'de bekletildi. 14.000xg'de 1 saat +4 °C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası oluşan çökelti atıldı. Süpernatanın miktarı ölçüldü; protein (36) ve aktivite (35) tayini yapılarak ikinci amonyum sülfat çöktürmesine geçildi.

3.2.2.2. % 65 Amonyum sülfat çöktürmesi

% 45 amonyum sülfat çöktürmesinden elde edilen berrak süpernatanın her 100 ml'si için 12.5 g amonyum sülfat eklenmek suretiyle, % 65 doygunluk sağlandı. Karışımın pH'sı 6 N amonyum hidroksit (NH₄OH) ile 7,5'a ayarlanıp 2 saat +4 °C'de bekletildi. 2 saat sonunda 14.000xg'de 1 saat santrifüjden sonra elde edilen çökelti toplanıp, süpernatın kısmı atıldı. Kalan çökelti, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 7.5 tamponunda çözüldü. Çökeltinin protein ve aktivite tayini yapıldı. (Bu durumda protein konsantrasyonu yaklaşık 40 mg/ml'dir).

3.2.3. Kromatografik Yöntemler

3.2.3.1. Sefadeks G-25 jel filtrasyonu

Sefadeks G-25 den 20 g tartılıp, 10 ml tamponda (10 mM'lık Tris) şişirildi ve kolona uygulanıp dengelendi. Uygulanan örneklerden, 2'şer ml'lik fraksiyonlar toplandı. Protein taramaları 280 nm absorbands değişimi ile yapıldı.

3.2.3.2. Fosfoşelüloz Afinité Kromatografisi

Sefadeks G-25 kolonundan amonyum sülfatı uzaklaştırılmış olarak alınan fraksiyonun önceden 280 nm okumaları yapılmış olanlarının tamamı protein (36) ve enzim aktivite (35) ölçümleri yapıldıktan sonra 2.5x50 cm'lik fosfoşelüloz kolona uygulandı. Kolon 50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA pH 7.5 tamponuyla dengelendi. Fosfoşelüloz kolonun yatak hacmi, 245 ml olarak hesaplandı.

3.2.4. Protein Tayini

Fruktoz 1,6-bisfosfat aldolaz saflaştırılması sırasında protein taraması, 280 nm'deki absorbands değişimlerinin takibi ile yapıldı. Örneklerdeki protein miktar tayini için Lowry yöntemi (36) kullanıldı. Bu yöntem, Folin fenol reaktifinin (Fosfo molibdik-fosfotungistik asit reaktifi) alkali koşullar altında, sarı olan renginin proteine bağlanması ile mavi renge dönüşmesi esasına dayanır. Protein miktarları, 37 °C'de 15 dakika inkübasyon sonrasında 750 nm'deki absorbandsların okunup protein standardı değerine oranlanması ile hesaplandı. Standart olarak sığır serum albumini (BSA) kullanıldı.

3.2.5. Enzim Aktivitesi Çalışmaları

3.2.5.1. Enzimatik Aktivite Tayini

Aldolaz aktivitesinin kantitatif ölçümü, fruktoz 1,6-bisfosfatın enzim tarafından yıkılımasının kolorimetrik olarak takibi ile yapıldı. Aldolaz aktivitesinin bir ünitesi; 37 °C'de ve optimum deney koşullarında, her bir mikromol substratın dakikadaki yıkılımasını sağlayan enzim miktarı olarak belirlendi. Spesifik aktivite; proteinin her miligramının ünite sayısı karşılığı olarak saptandı (35). Yöntemin temel

prensibi, oluşan ürünün bazik ortamda DNPH ile hidrazon (sarı renkli) oluşturması esasına dayanır. FBP'den, DHAP ve GA3P oluşur oluşmaz, hidrazin tarafından tutulur. Daha sonra, dinitrofenilhidrazinle kromojen kompleksler oluştururlar.

0.05 M TEA-EDTA tamponu, trietanolaminden 6.85 ml alınıp, EDTA'dan 90.44 mg/l eklenerek karıştırıldı. Tamponun pH'sı, 0.1 N HCl ile 7.4'e ayarlandı. 0.056 M hidrazin sülfat, %10'luk TCA (trikloroasetik asit), 0.75 N NaOH hazırlandı. DNPH (dinitrofenil hidrazin) %0.1 lik: 250 mg DNPH 2 N HCl'de çözüldükten sonra süzüldü. Elde edilen süzütünün hacmi 2 N HCl ile 250 ml'ye tamamlandı. 50 mM substrat (FBP₂, fruktoz 1,6-bisfosfat) hazırlandı. Tüm reaktifler 0.05 M TEA-EDTA pH 7.4 tamponunda taze olarak hazırlandı. Aktivite ölçümü için polistren tüpler kullanıldı. Her bir enzim örneği için, örnek ve kör olmak üzere iki ölçüm yapıldı. Her bir örnek en az iki kez olmak üzere çoklu çalışıldı. Bu sonuçların ortalamaları alınarak hesaplamaları yapıldı.

Aktivite ölçümü için örnek ve kör tüplerine sırasıyla 0.7'şer ml TEA-EDTA tamponu pipetlendi. Daha sonra 0.1 ml hidrazin sülfat ve 0.1 ml enzim pipetlenip alt üst edilerek 37 °C' de 5 dakika inkübe edildi. 5 dakika sonunda, sıcak su banyosundan tüpler çıkarılmadan, yalnızca örnek tüpüne 0.1 ml substrat (FBP₂, 50 mM) pipetlenip karıştırılarak, 30 dakika 37 °C' de inkübasyona devam edildi. Bu aşamada, kör tüpüne substrat eklenmedi. Yarım saatlik inkübasyon sonunda, tüpler su banyosundan çıkarılarak kör tüpüne 0,1 ml substrat eklendi. Hemen ardından, hem örnek hem de kör tüplerine 1'er ml TCA (% 10) eklenip karıştırıldı. Tüpler 10 dakika 2000 rpm'de santrifüj edildikten sonra, üstteki berrak kısımdan dikkatlice 0.5 ml alındı. Alınan örnekler, yeni örnek ve kör tüplerine pipetlenerek, 0.75 N NaOH'den 0.5 ml eklendikten sonra, 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Bu süre sonunda % 0.1'lik DNPH'den 0.5'er ml her iki tüpe pipetlenerek 37 °C'de 10 dakika daha inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun hemen ardından tüplere 3.5 ml NaOH pipetlenerek, 5 dakika sonunda 540 nm'de spektrofotometrik okumaları yapıldı. Renk stabilitesi açısından tüplerin tamamının, 15 dakika içinde okunmasına dikkat edildi.

3.2.5.2. Enzim Aktivite Ölçüm Yönteminin Optimizasyonu

3.2.5.2a. pH optimizasyonu

pH değerleri 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.25, 7.4, 8.0 ve 8.5 olacak şekilde 0.05 M derişiminde TEA-EDTA tamponu hazırlandı. Farklı pH değerlerindeki bu tamponlarla hem sağlıklı hem de diyabetik insan plasenta dokusundan saflaştırılan FBP₂ aldolaz aktiviteleri ölçüldü.

3.2.5.2b. Optimum sıcaklığın saptanması

10, 15, 20, 25, 30, 37, 45, 50 ve 60 °C'de aktivite tayini yapıldı. Farklı sıcaklıklarda her iki dokudan saflaştırılan FBP₂ aldolaz aktiviteleri ölçüldü, değerleri grafiklendi.

3.2.5.2c. Zaman optimizasyonu

Enzim aktivite ölçüm yönteminde uygulanan, 37 °C lik inkübasyon 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 45, 50 ve 60. dakikalarda yapıldı. 37 °C lik inkübasyonda hem sağlıklı insan plasental aldolazı, hem de gestasyonel diyabetli insan plasental aldolazı için maksimum absorbans ve maksimum aktivitenin sağlandığı süre bulundu.

Zaman optimizasyonunun ikinci aşaması olarak, enzimatik ölçüm yönteminin son aşaması olan hidrazon oluşumunu takip eden bekleme süresinin optimizasyonu yapıldı. Bunun için, 0, 5, 10, 30, ve 60 dakika sonra okumalar yapıldı. Her iki saf enzim örneğinden elde edilen değerler grafiklenerek, hidrazon oluşumundan sonraki optimum okuma süresi saptandı.

3.2.5.3. Kinetik Çalışmalar

Substrat, (FBP₂, fruktoz 1,6-bisfosfat) 1 M 340.1 g'dan 50 mM'lık hazırlandı. Tüm reaktifler 0.05 M TEA-EDTA pH 7.4, tamponunda ve taze olarak kullanıldı.

Aktivite ölçümü için polistren tüpler kullanıldı. Her bir enzim örneği için, örnek ve kör olmak üzere iki ölçüm yapıldı. Her bir örnek en az iki kez olmak üzere çoklu çalışıldı. Ortalamaları alınarak hesaplamaları yapıldı.

İlk hızların ölçülmesinde, 0.05 M TEA-EDTA tamponu (pH: 7.4) içinde hazırlanmış 0,1-50 mM arasındaki FBP ve 27 µg/ml sağlıklı ve diyabetik insan plasental Aldolazı, aktivite karışımı olarak kullanıldı. Ölçülen ilk hızların, farklı substrat derişimlerine karşı grafiklemesi yapılarak, enzimatik tepkime hızı/substrat derişimini ifade eden Michaelis-Menten grafikleri çizildi.

Çalışmada, her iki dokudan saflaştırılan FBPA'nın substrat ve inhibitör kinetiği çalışmaları yapıldı. Farklı substrat konsantrasyonlarında enzimin substrat kinetiği çalışmaları yapıldı. DHAP, ATP ve Mg⁺² un, sağlıklı ve gestasyonel diyabetik insan plasental aldolazı üzerine inhibisyon etkisi incelendi. İnhibitörler, aktivite ortamına uygun miktarlarda katıldı.

3.2.6. SDS-PAGE Elektroforezi

Elde edilen saf enzim örnekleri, molekül ağırlığının saptanması ve saflık kontrolü için SDS-PAGE elektroforeze uygulandı. Elektroforetik işlemler için, Laemmli'den modifiye edilen yöntem esas alındı (34). Elektroforetik ayırım, miniprotean II-Biorad sistemi kullanılarak, oda sıcaklığında yapıldı.

SDS-Poliakrilamid jel elektroforezinde, % 7,5'luk separatör ve % 4,5'lik "staging jel" hazırlandı. "Staging" jel hazırlama tamponu olarak 1,5 M Tris-HCl, pH 6,8; Separatör jel için de 1,5 M Tris-HCl tamponu, pH 8,8 kullanıldı. Normal ve diyabetli plasentadan saflaştırılan enzim örnekleri ve standart karışımlarından 5 µL alındı; kuyucuklara uygulanmadan önce 2 µL sodyum dodesil sülfat (SDS, %2,5) ve 2 µL 2 merkapt etanol (β-ME, % 5) ile 5 dakika kaynatıldı. Soğutulduktan sonra her birine 5 µL bromfenol blue (BFB) ve 10 µL gliserol eklemek suretiyle kuyucuklara uygulanacak örnekler hazırlanmış oldu.

Bu haliyle kuyucuklara 100 µg örnek uygulanmış oldu. Uygulama, 50 dakika 100 Volt'ta ve oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Uygulama süresi ve akım denemek suretiyle optimize edildi. Yürütme sonunda, jeller Coomassie Brilliant Blue-R250 boyasıyla (CBB, % 0,1) yaklaşık 16 saat boyandı. Boya çıkarma işlemi (destaining), % 25 metanol ve % 10'luk asetik asit karışımıyla yapıldı. Jeller % 10'luk asetik asitte saklandı.

Elde edilen saf enzim örnekleri, moleköl ağırlığının saptanması ve saflık kontrolü için SDS-PAGE elektroforeze uygulandı. İlk jelde marker olarak, SDS-6H (karbonik anhidraz (29.000), yumurta albumini (45.000), BSA (66.000), fosforilaz B (97.000) kullanıldı. Bu karışım, SDS-PAGE'de tek kuyucuğa uygulanarak marker olarak kullanıldı.Yapılan ikinci SDS-PAGE'de tavşan kas aldolazıyla (40 kDa, kuyucuk:2 ve 5), karbonik anhidraz (kuyucuk:1 ve 8) marker olarak kullanıldı.

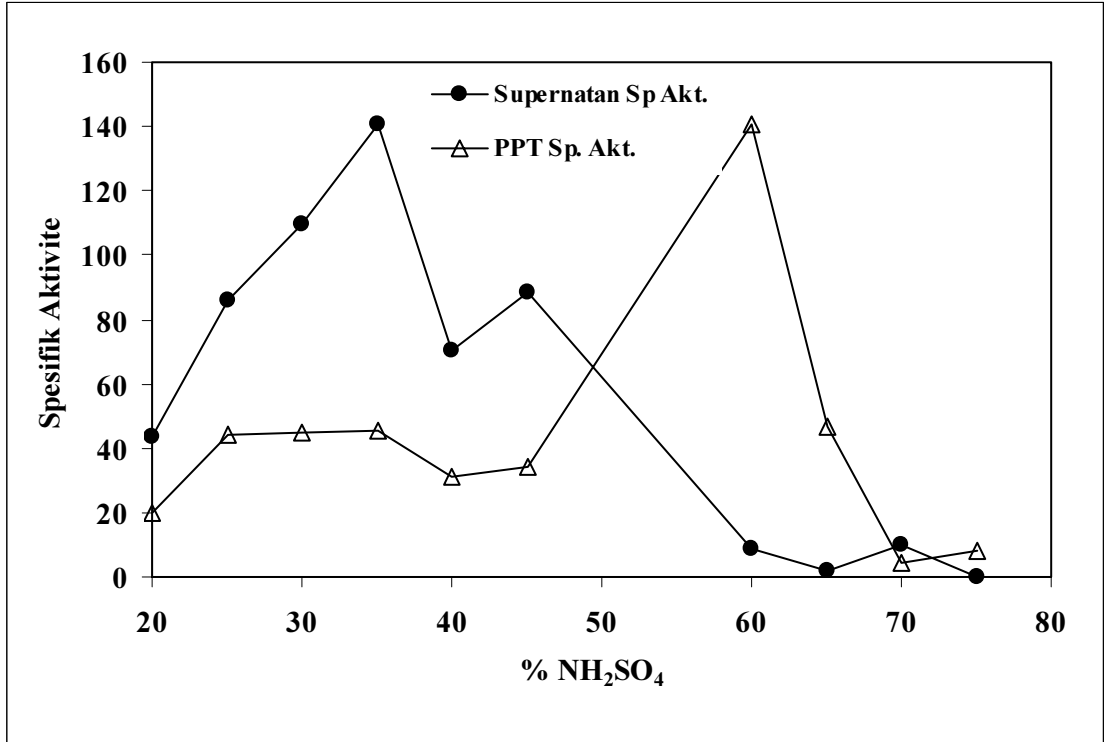
3.2.7. İstatistiksel Değerlendirmeler

Substrat affinite sabitleri, Michaelis-Menten grafiklerinin analizi, Systat (Version 11, 2005) nonlineer regresyon analizi programı kullanılarak yapıldı ve kinetik parametreler saptandı.

4. BULGULAR

4.1. Aldolaz Enziminin Saflaştırılması

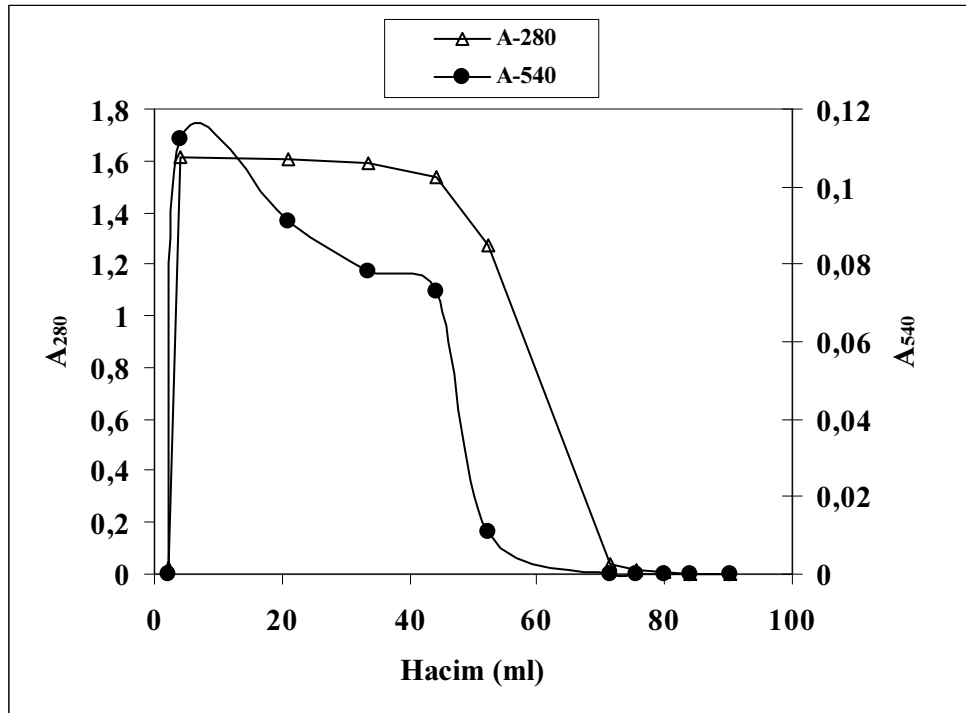
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Doğum Kliniği'nden sağlanan taze insan plasenta dokusu, homojenizasyon ve amonyum sülfat çöktürmesi yöntemleri ile muamele edildi. Amonyum sülfatlama aralığı, %20 ile %75 arasında çalışıldı. Buna göre amonyum sülfat çöktürmesi için en uygun aralığın %45-65 arası olduğu bulundu (Şekil 4.1). Kolon kromatografisine uygulanacak örneğin protein konsantrasyonu 40 mg/ml olarak hesaplandı.



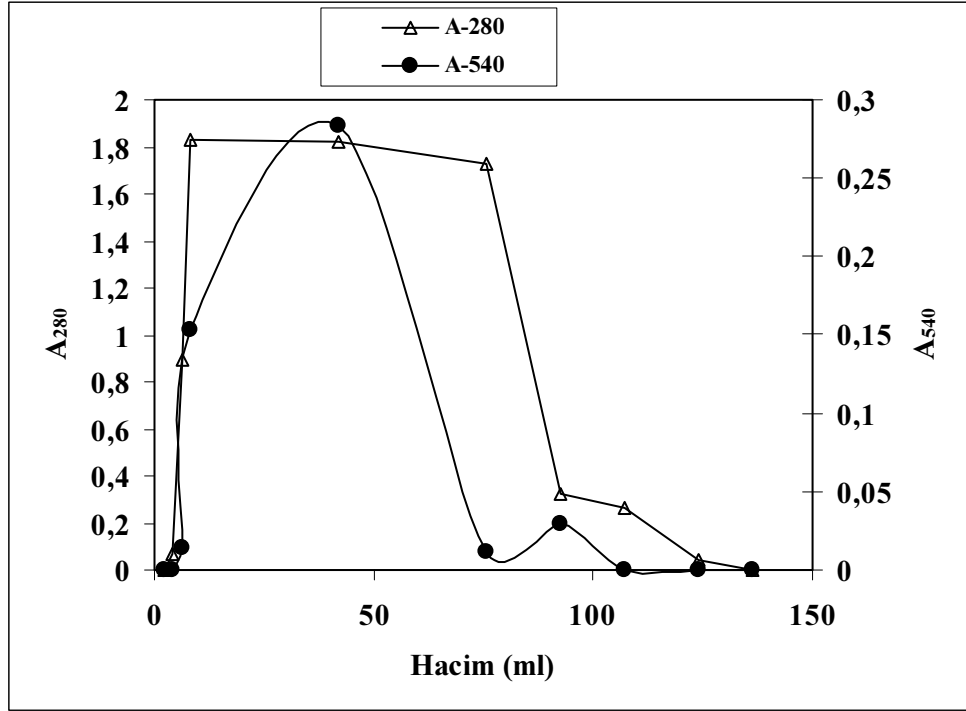
Şekil 4.1: Amonyum Sülfat Kesitlemesi; supernatan ve çökeltide spesifik aktivite dağılımı.

4.1.1. Sefadexs G-25 Kolon Kromatografisi

%45-% 65'lik amonyum sülfat aralığından elde edilen çökelti, G-25 Sefadexs kolonuna uygulandı (şekil 4.1.1a, 4.1.1b). 20 g G-25 Sefadexs, 10 ml 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 7,5 tamponunda şişirildi ve kolona uygulanıp dengelendi. Bu kolondan elde edilen örneklerden protein ve aktivite tayini yapılarak, yüksek aktiviteye sahip fraksiyonlar toplandı. Böylece örneklerden tuz uzaklaştırılmış oldu.



Şekil 4.1.1.a: Sağlıklı Plasental Aldolazın Sefadexs-G25 Kolondan Elüsyon Grafiği



Şekil 4.1.1b: GDM'li Plasental Aldolazın Sefadeks-G25 Kolondan Elüsyon Grafiği

4.1.2. Fosfoşelüloz Afinit Kromatografisi

Sefadeks G-25 kolonundan amonyum sülfatı uzaklaştırılmış (yani tuzdan arındırılmış) olan fraksiyonun protein (36) ve enzim aktivite (35) ölçümleri yapıldıktan sonra, 2,5x50 cm'lik fosfoşelüloz kolona uygulandı. Kolon 50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA pH 7.5 tamponuyla dengelendi.

50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA pH 7.5 tamponuyla, görünür olan dar kırmızı band kolondan çıkıncaya ve 280 nm'de optik dansite 0.100'ün altına düşünceye dek yıkandı. Aldolazın substratıyla elüsyonunu sağlamak için kolon, 50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA (pH 7,5) tamponunda hazırlanan 2,5 mM Fruktöz 1,6-bisfosfat ile yıkanarak saf enzim kolondan elüe edildi.

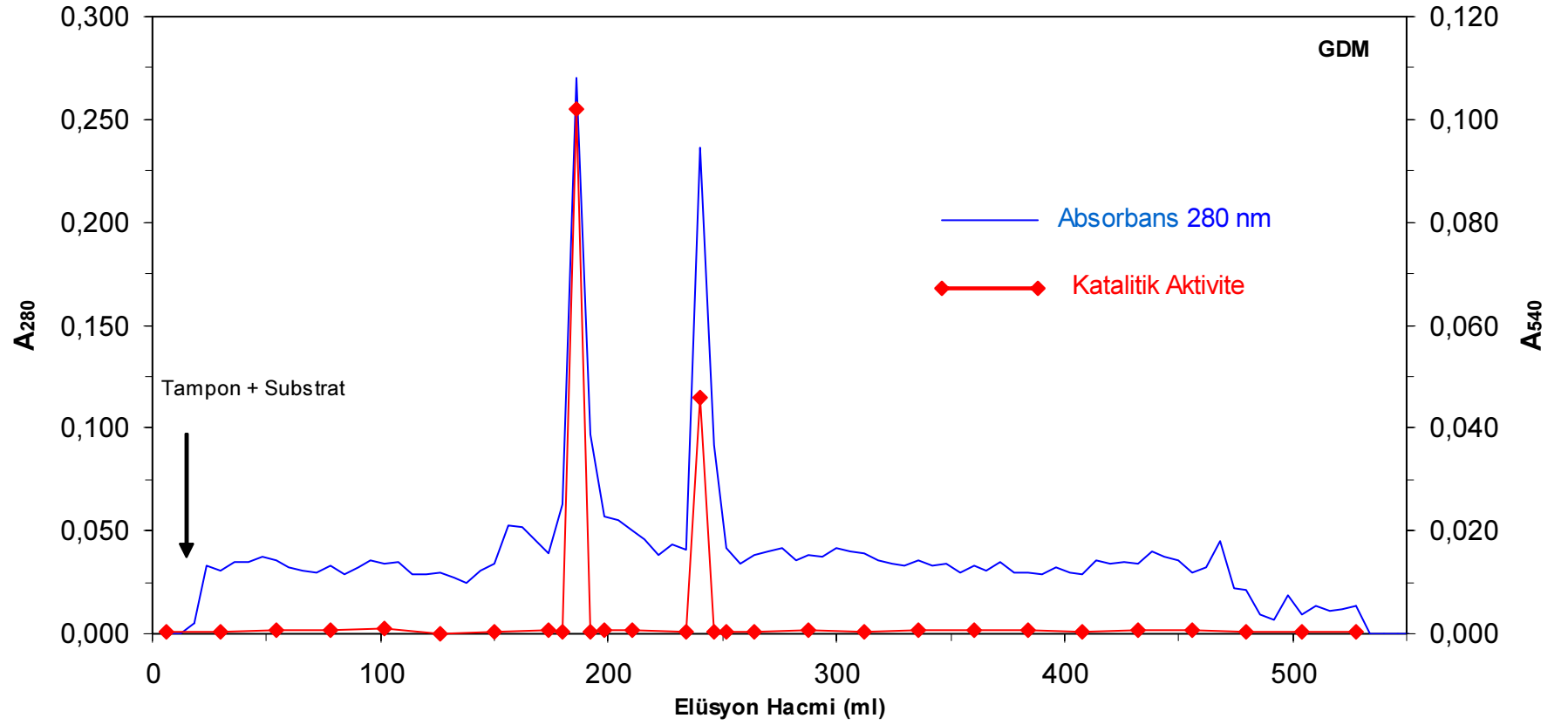
Penhoet'in yöntemi (37) modifiye edilerek geliştirilen metodla enzim, sağlıklı insan plasentasından 40.5 kez (Tablo 4.1.1), diyabetik insan dokusundan 63 kez saflaştırıldı (Tablo 4.1.2).

Tablo 4.1.1: Fruktoz 1,6 Bisfosfat Aldolazın Sağlıklı İnsan Plasantasından Saflaştırılması

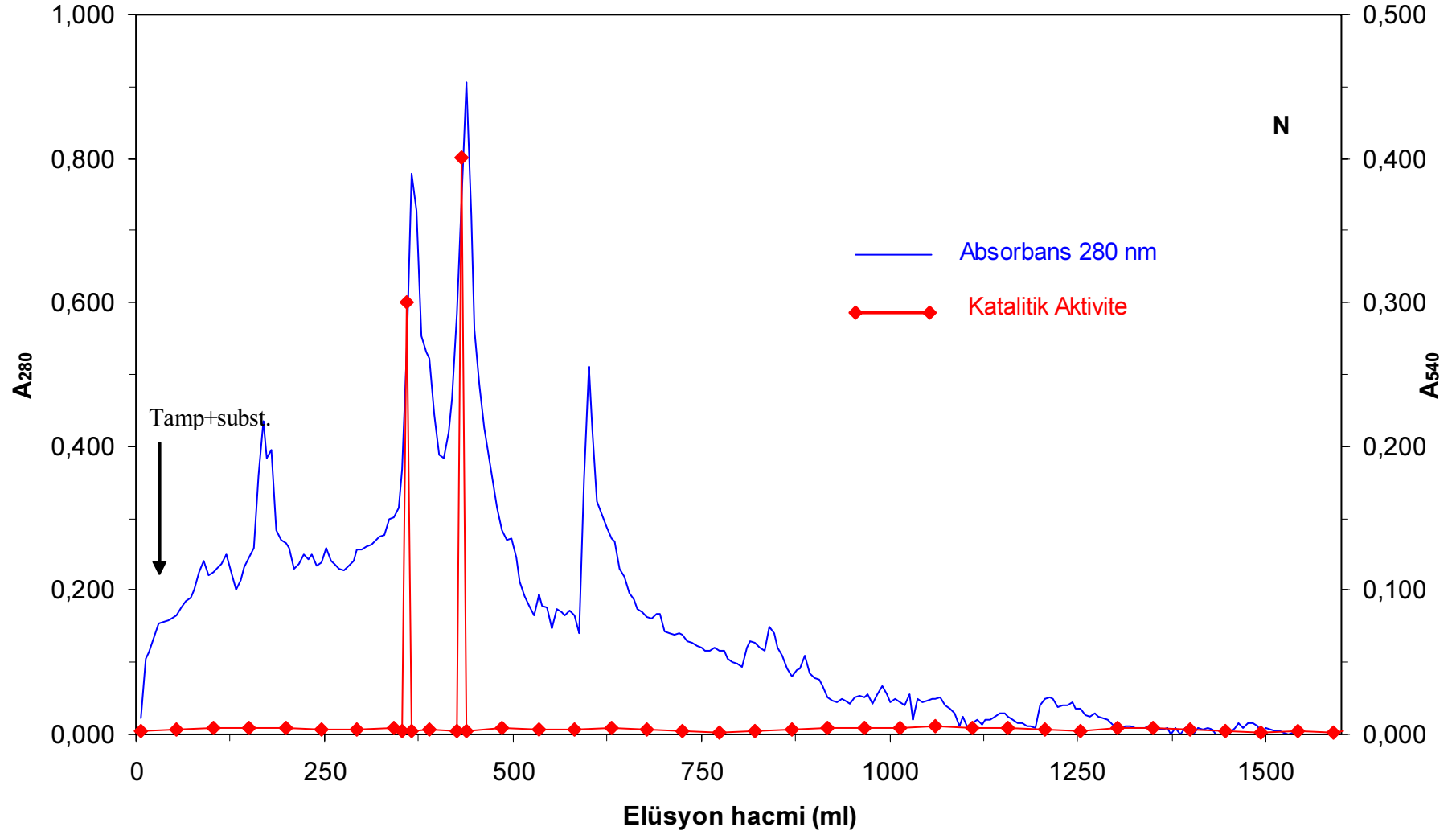
BASAMAKLAR	TOTAL HACİM (ml)	PROTEİN (mg/ml)	TOTAL PROTEİN (mg)	SPESİFİK AKTİVİTE (mU/mg protein)	TOTAL AKTİVİTE (U)	SAFLAŞTIRMA ORANI
14000xg supernatant	3110	16.77	52154	20.54	1071.74	1
45 % Amonyum Sülfat Fraks.	3382	9.98	33752	78.35	2644.72	3.8
65 % Amonyum Sulfat Fraks.	98.3	51.13	5026	78.24	393.24	3.8
Sephadeks G-25 Kolonu	185	27.02	5000	83.96	419.45	4.0
Fosfoşelüloz Kolonu	6	6.4	38.4	831.90	321.41	40.5

Tablo 4.1.2: Fruktoz 1,6 Bisfosfat Aldolazın Diyabetik İnsan Plasantasından Saflaştırılması

BASAMAKLAR	TOTAL HACİM (ml)	PROTEİN (mg/ml)	TOTAL PROTEİN (mg)	SPESİFİK AKTİVİTE (mU/mg protein)	TOTAL AKTİVİTE (U)	SAFLAŞTIRMA ORANI
14000xg supernatant	1520	14.24	21644	9.38	209.7	1
% 45 Amonyum Sulfat Fraks.	1670	11.76	19639	22.72	446.20	2.40
% 65 Amonyum Sulfat Fraks.	92.4	38.08	3518.59	70.16	246.86	7.47
Sephadeks G-25 Kolonu	105	31.28	3284.4	36.304	119.24	3.87
Fosfoselüloz Kolonu	6	1.904	11.424	590.94	67.50	63



Şekil 4.1.2b: GDM'li Plasental Aldolazım Fosfoselüloz Kolondan Elüsyon Grafiği



Şekil 4.1.2a: Sağlıklı Plasental Aldolazın Fosfoselüloz Kolondan Elüsyon Grafiği

Normal insan plasentasında spesifik enzim aktivitesi 831.90 mU/mg protein olarak bulundu; diyabetli insan plasentasından saflaştırılan enzimin spesifik aktivitesi 590.94 mU/mg protein olarak saptandı.

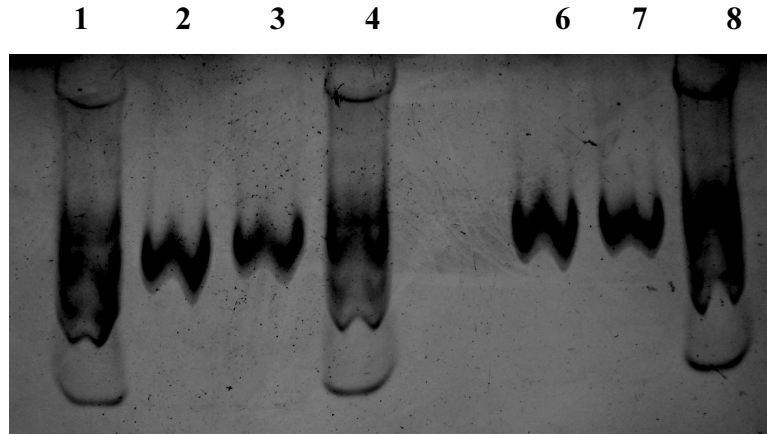
Sağlıklı insan plasental aldolazının fosfosellüloz kolondan elüsyon grafiği Şekil 4.1.1.'de, diyabetli plasentaya ait elüsyon grafiği ise Şekil 4.1.2.'de gösterilmiştir.

Elüsyon grafiğinde görülen birbirini takip eden bu iki zirvede enzim aktivitesi gözlemlendi. Sağlıklı plasental aldolazın elüsyon grafiğinde görülen ilk zirveden toplanan elüatın spesifik aktivitesi 820 mU/mg protein, GDM'li plasental aldolazın elüsyon grafiğinde görülen ikinci zirveden toplanan elüatın spesifik aktivitesi ise 499 mU/mg protein olarak bulundu. Grafiklerde de görülen iki zirveden elde edilen eluatlarla daha sonraki çalışma aşamalarına geçildi.

4.2. Elektroforetik İncelemeler

4.2.1. SDS-PAGE Elektrofrezisi

Elde edilen saf enzim örnekleri, molekül ağırlığının saptanması ve saflık kontrolü için SDS-PAGE'ye uygulandı (34). Marker olarak, SDS-6H (karbonik anhidraz (29.000), yumurta albumini (45.000), BSA (66.000), fosforilaz B (97.000) kullanıldı. Bu karışım, SDS-PAGE'de tek kuyucuğa uygulanarak marker olarak kullanıldı. İlk jelde saf enzimin molekül ağırlığının 45 ila 97 kDa arasında olduğu sonucuna varıldı (4.2.1a). Yapılan ikinci SDS-PAGE'de tavşan kas aldolazıyla (40 kDa, kuyucuk:2 ve 5), karbonik anhidraz (kuyucuk:1 ve 8) marker olarak kullanıldı.

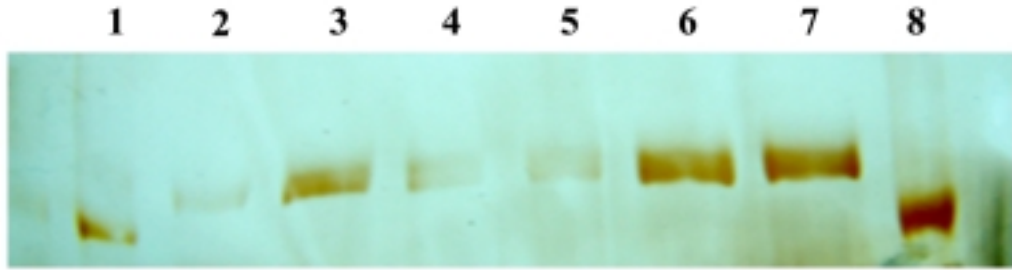


Şekil 4.2.1a: Sağlıklı ve gestasyonel diyabetik insan plasental aldolazının SDS-Poliakrilamid jel elektrofrezisi. (1, 4, 8: markerlar; 2 ve 6: sağlıklı insan plasental aldolazı; 3 ve 7: gestasyonel diyabetli insan plasental aldolazı).

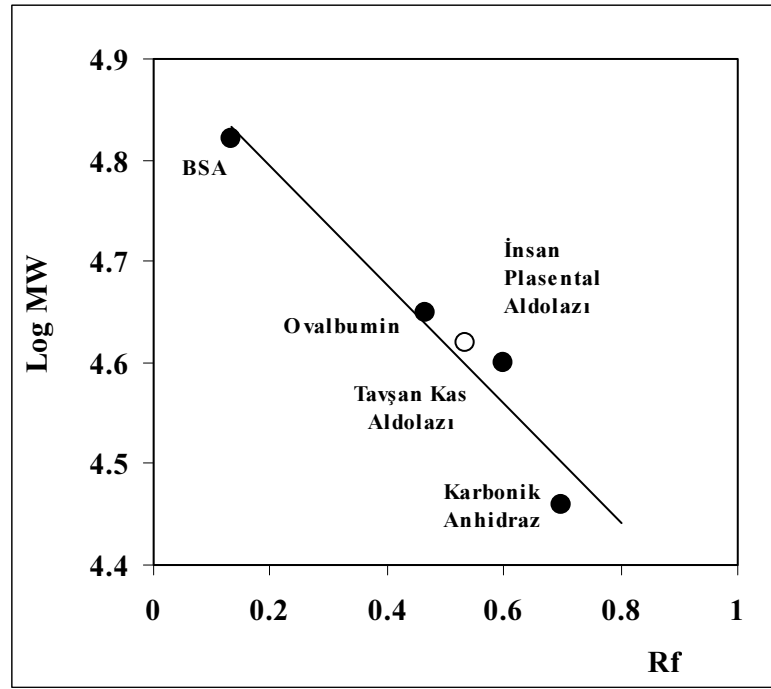
Yapılan ikinci SDS-PAGE'de 1-4. kuyucuklara 10'ar µl örnek uygulanırken, 5-8. kuyucuklara 20'şer µl uygulandı.

Elektroforetik uygulamalar sonucunda, insan plasental aldolazının molekül ağırlığının, tavşan kas aldolazı ile benzer olduğu gözlemlendi (Şekil 4.2.1b).

Logaritmik olarak markerların molekül ağırlıklarıyla karşılaştırıldığında insan plasental aldolazının molekül ağırlığının yaklaşık 160 kDa olduğu saptandı (Şekil 4.2.1c).



Şekil 4.2.1b: Sağlıklı ve gestasyonel diyabetik insan plasental aldolazının SDS-Poliakrilamid jel elektroforezi (1 ve 8 karbonik anhidraz, 2 ve 5 tavşan kası aldolazı, 3 ve 6 sağlıklı plasental aldolaz, 4 ve 7 gestasyonel diyabetli insan plasental aldolazı).



Şekil 4.2.1c: Sağlıklı ve GDM'li Plasental Aldolazın Molekül Ağırlıklarının Dağılımı

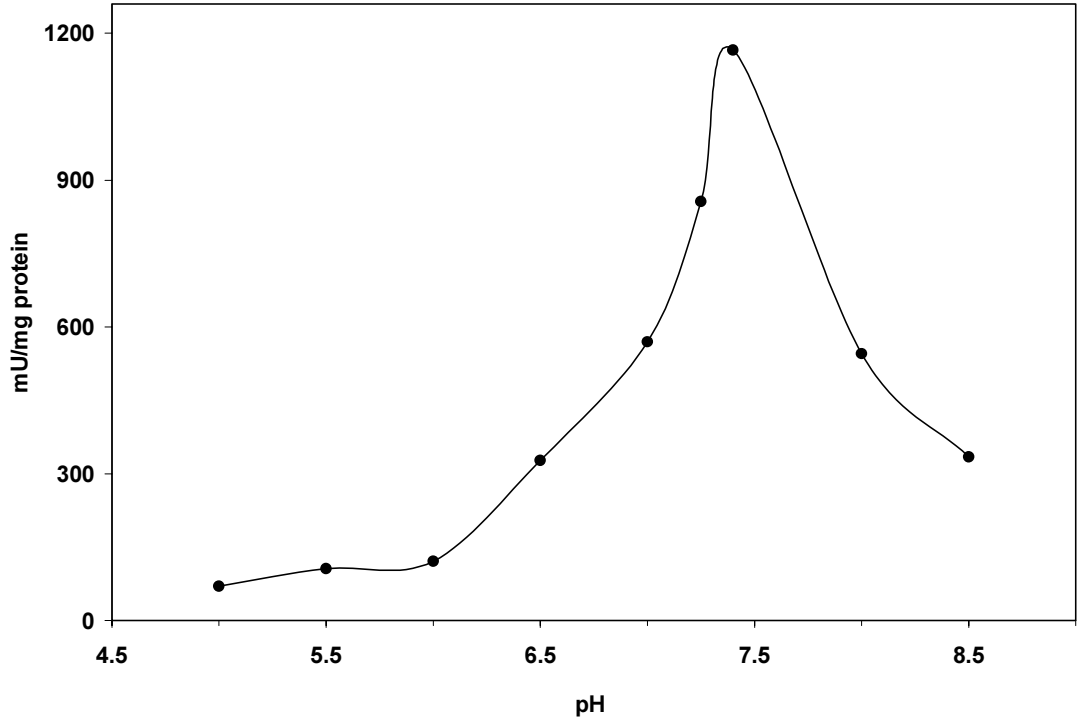
4.3. Enzim Aktivitesi Çalışmaları

4.3.1. Enzim Aktivite Ölçüm Yönteminin Optimizasyonu

4.3.1.1. pH optimizasyonu

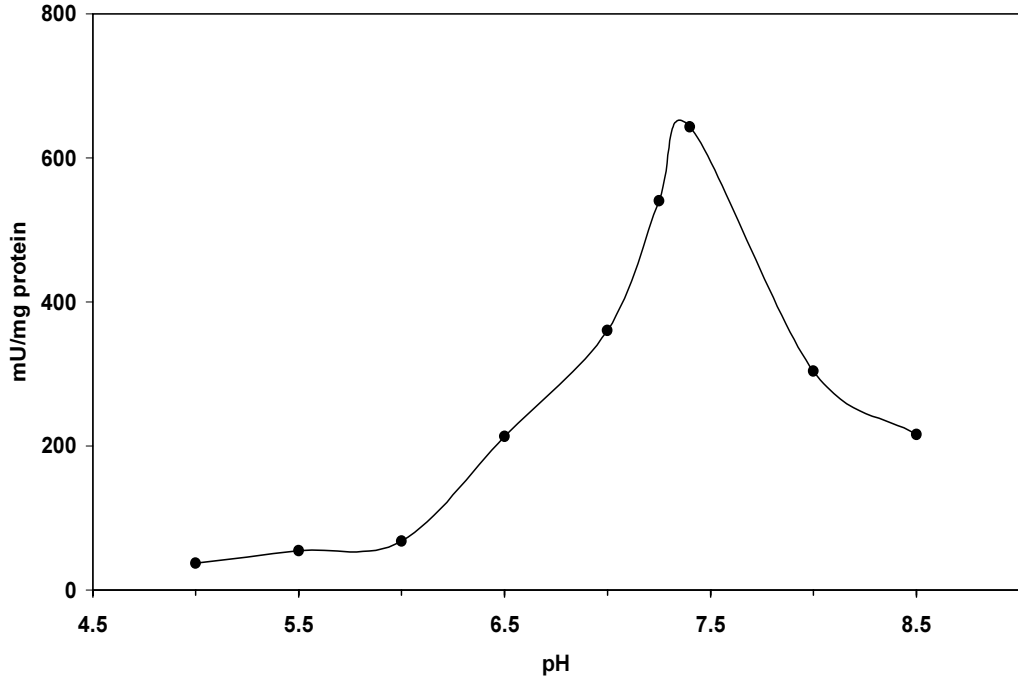
pH değerleri 5.0-8.5 arasında değişen TEA-EDTA tamponları ile aktivite tayini yapıldı.

Sağlıklı insan plasental aldolazının optimum pH grafiği şekil 4.3.1.1a'da gösterilmiştir. Farklı pH'larda ölçülen aktivite değerlerinin grafiklenmesi ile optimum pH grafiği çizildi. Bu grafiğe göre, sağlıklı insan plasental aldolazının optimum pH'sı 7.4 olarak saptandı.



Şekil 4.3.1.1a: Sağlıklı İnsan Plasental Aldolazının Optimum pH Grafiği.

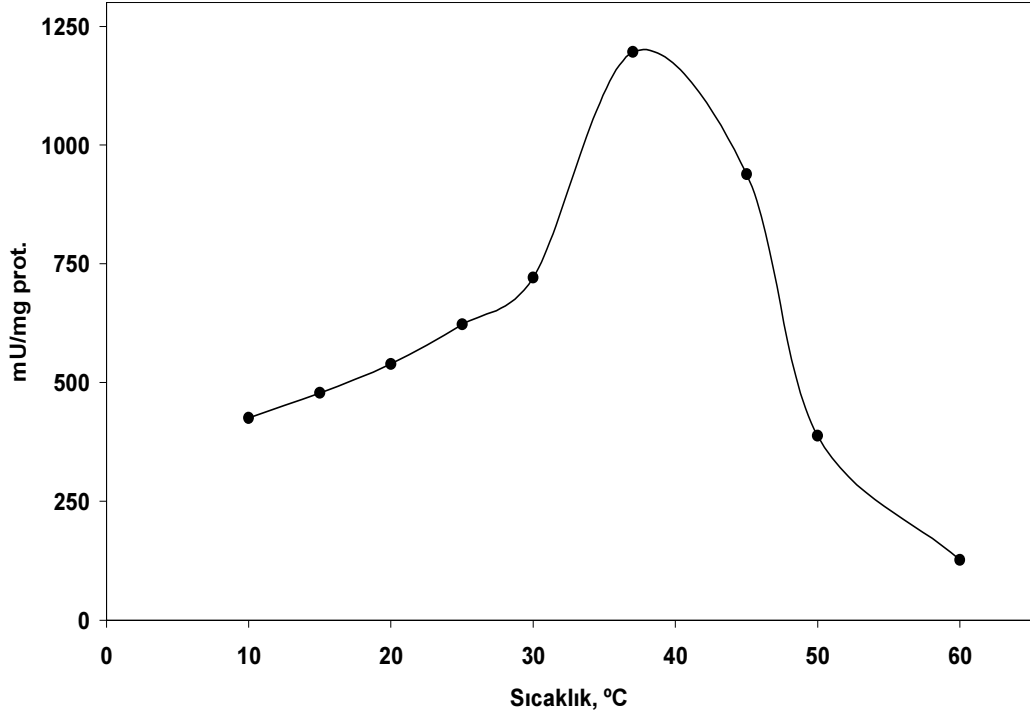
Gestasyonel diyabetli insan plasentasından saflaştırılan aldolazın optimum pH grafiği, Şekil 4.3.1.1b'de gösterilmiştir. Sağlıklı insan plasental aldolazında olduğu gibi, enzim için optimum pH'nın 7.4 olduğu bulunmuştur.



Şekil 4.3.1.1b: Gestasyonel diyabetli insan Plasental aldolazının optimum pH grafiği

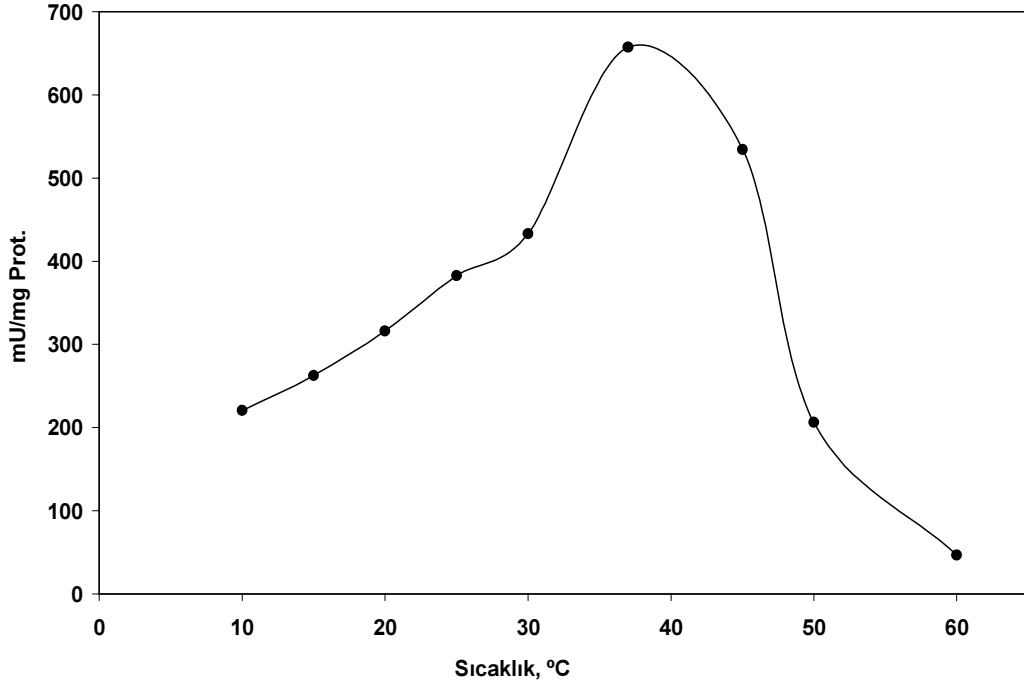
4.3.1.2. Optimum sıcaklığın saptanması

10, 15, 20, 25, 30, 37, 45, 50 ve 60 °C'de aktivite tayini yapıldı. Her bir sıcaklık değerine karşılık ölçülen aktivite değerleri grafiklenerek, sağlıklı insan plasental aldolazının optimum sıcaklığı 37 °C olarak saptandı (Şekil 4.3.1.2a).



Şekil 4.3.1.2.a: Sağlıklı insan plasental aldolazının optimum sıcaklık grafiği

Gestasyonel diyabetli insan plasentasından saflaştırılan aldolazın optimum sıcaklığının saptanması için 10, 15, 20, 25, 30, 37, 45, 50 ve 60 °C'de aktivite tayini yapıldı. Aynı şekilde, enzim için optimum sıcaklığın 37 °C olduğu gösterildi (Şekil 4.3.1.2b).

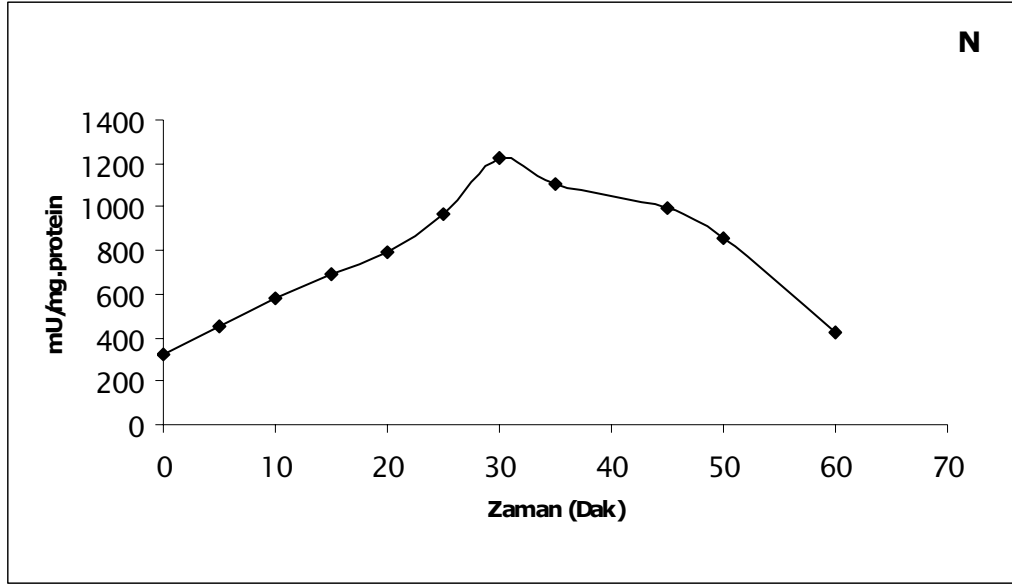


Şekil 4.3.1.2.b: Gestasyonel diyabetli insan plasental aldolazının optimum sıcaklık grafiği.

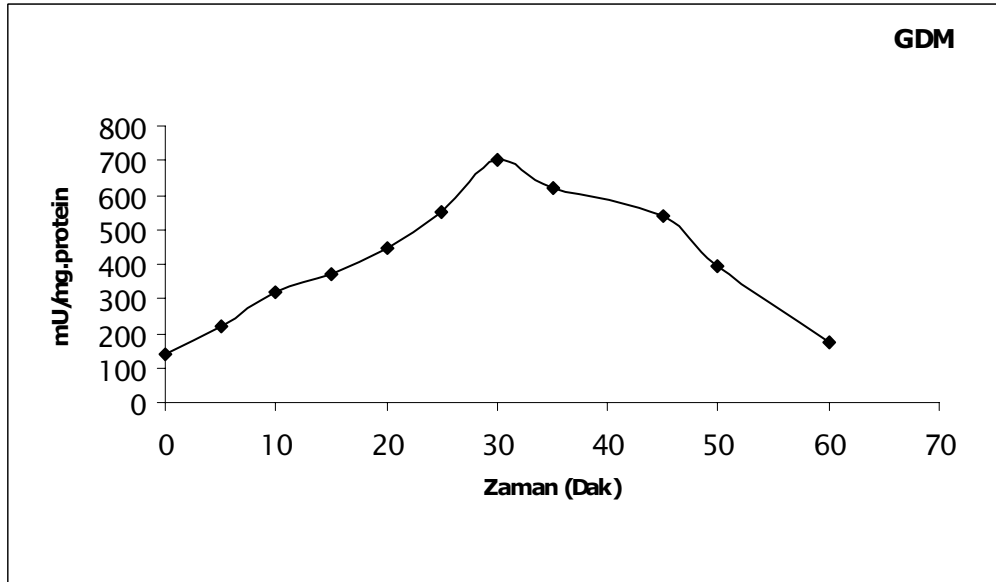
4.3.1.3. Zaman optimizasyonu

4.3.1.3a. İnkübasyon zamanının optimizasyonu

37 °C lik inkübasyonda hem sağlıklı insan plasental aldolazı (Şekil 4.3.1.3a), hem de gestasyonel diyabetli insan plasental aldolazı (Şekil 4.3.1.3.b) için maksimum absorban ve maksimum aktivitenin sağlandığı süre 30 dakika olarak saptandı. Böylece inkübasyon için gereken optimum süre, 30 dakika olarak belirlendi.



Şekil 4.3.1.3.a: Sağlıklı insan plasental aldolazının enzimatik ölçüm yönteminin inkübasyon zamanı optimizasyonu.



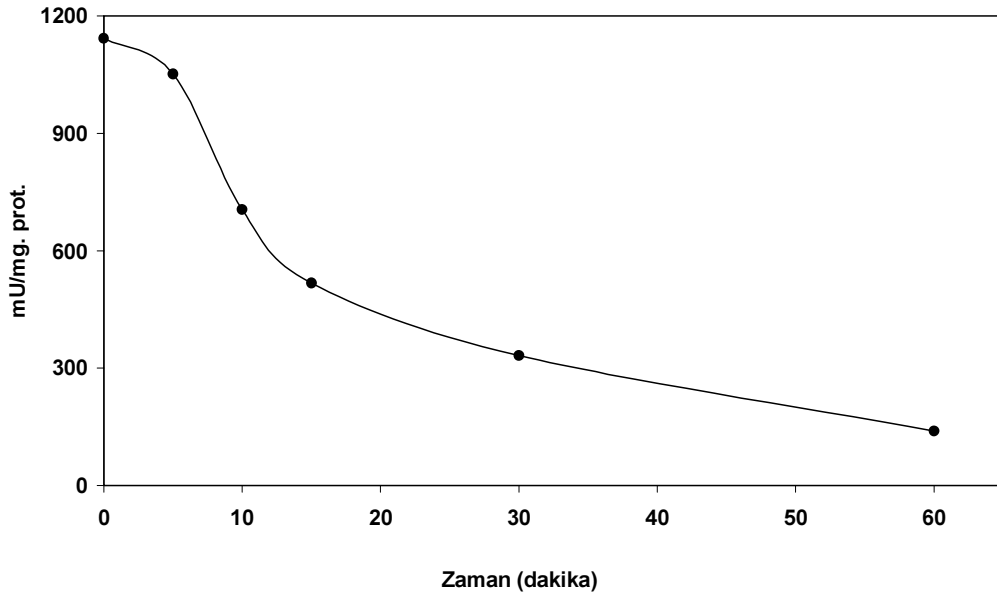
Şekil 4.3.1.3.b: Gestasyonel diyabetik insan plasental aldolazının enzimatik ölçüm yönteminin inkübasyon zamanı optimizasyonu.

4.3.1.3b. Bekleme süresinin optimizasyonu

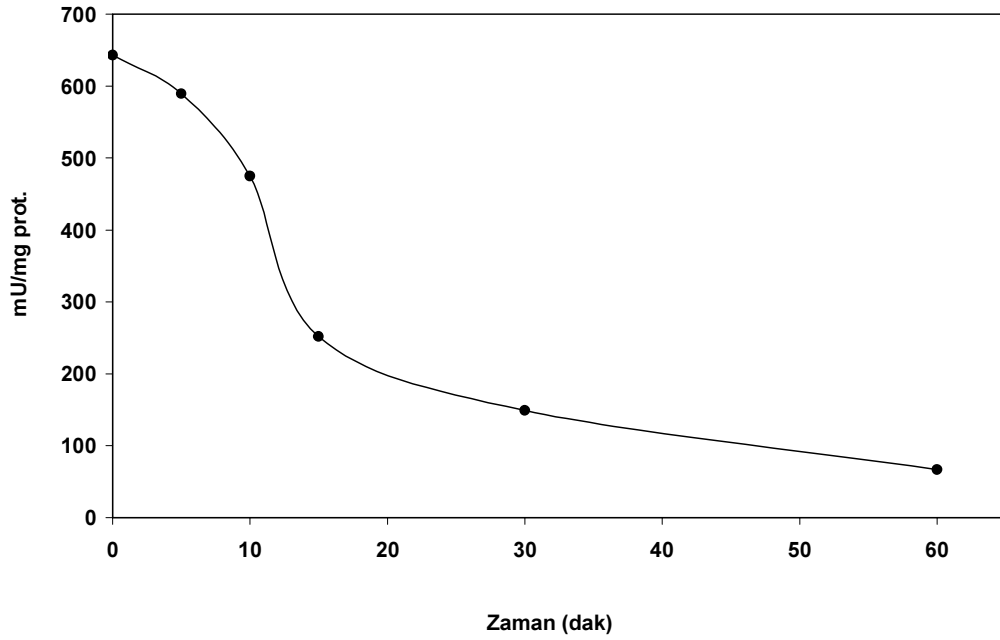
Enzimatik ölçüm yönteminin son aşaması olan hidrazon oluşumunu takip eden bekleme süresinin optimizasyonu için 0, 5, 10, 30, ve 60 dakika sonra okumalar yapıldı.

Sağlıklı insan plasentasından saflaştırılan aldolaza ait okuma sürelerine göre elde edilen grafik Şekil 4.3.1.4a'da gösterilmiştir. Bu grafiğe göre, oluşan renk 0. ile 5. dakikalarda stabil iken, bekleme sürelerine bağlı olarak okuma değerlerinin azaldığı saptanmıştır.

Şekil 4.3.1.4b'de gestasyonel diyabetli insan plasental aldolazının hidrazon oluşumunu takip eden 0, 5, 10, 30, ve 60 dakikalardaki ölçüm değerleri verilmiştir. Bu grafiğe göre, değerler 0. ile 5. dakikalarda kararlı iken, bekleme sürelerinin uzamasına bağlı olarak aktivite değerlerinde azalma olduğunu saptanmıştır.



Şekil 4.3.1.4a: Sağlıklı insan plasental aldolazının enzimatik ölçüm yönteminin spektrofotometrik okuma süresine ait zaman optimizasyonu.



Şekil 4.3.1.4.b: Gestasyonel diyabetik insan plasental aldolazının enzimatik ölçüm yönteminin spektrofotometrik okuma süresine ait zaman optimizasyonu.

4.3.2. Kinetik Çalışmalar

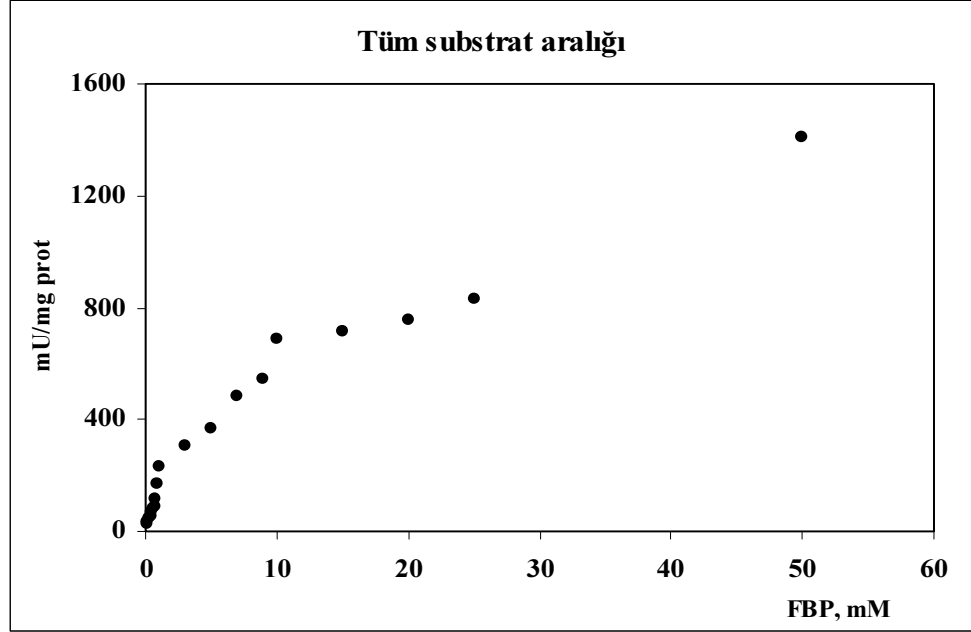
4.3.2.1. Sağlıklı İnsan Plasental Aldolazının Substrat Kinetiği

FBP'ye ait kinetik parametrelerin (V_m , K_m) hesaplanması, Systat 11 istatistik programının non-lineer regresyon modülünde inhibisyon modellerine uyumu üzerinden sağlandı.

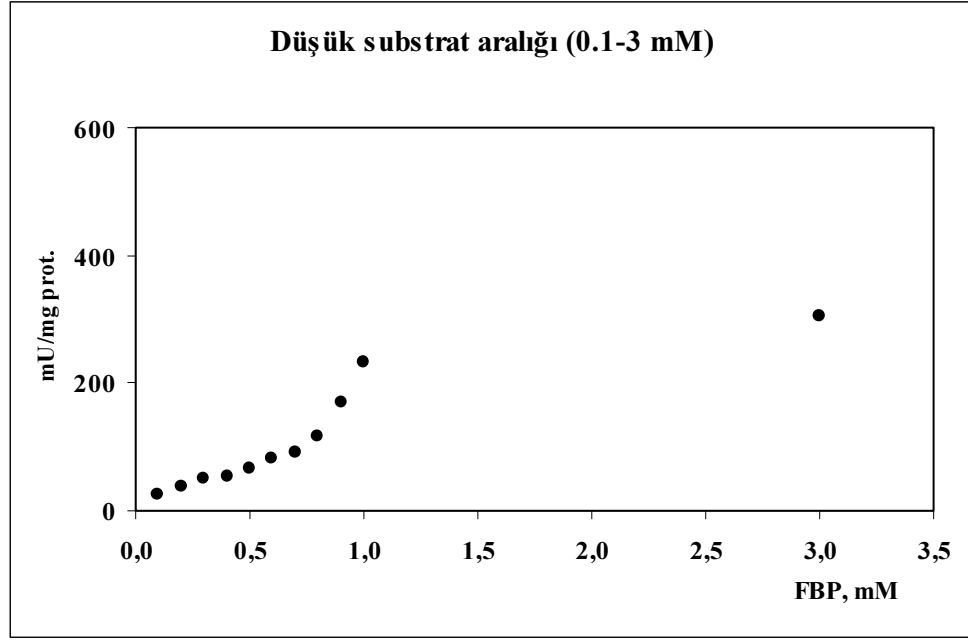
Sağlıklı insan plasental FBPA'nın tüm substrat derişimleri için V_m değeri $1769,513 \pm 200,322$ iken K_m değeri $20,003 \pm 4,497$ mM olarak bulundu.

Ölçülen ilk hızların, çalışılan tüm substrat derişimlerine karşı grafiklenmesi ile, Michaelis-Menten grafikleri çizildi (Şekil 4.3.2.1a). Tüm substratlarla çizilen Michaelis-Menten grafiklemesinde iki fazın olduğu gözlemlendiğinden, düşük (4.3.2.1b) ve yüksek (4.3.2.1c) substrat derişimlerden iki ayrı grafik daha çizildi. Buna göre,

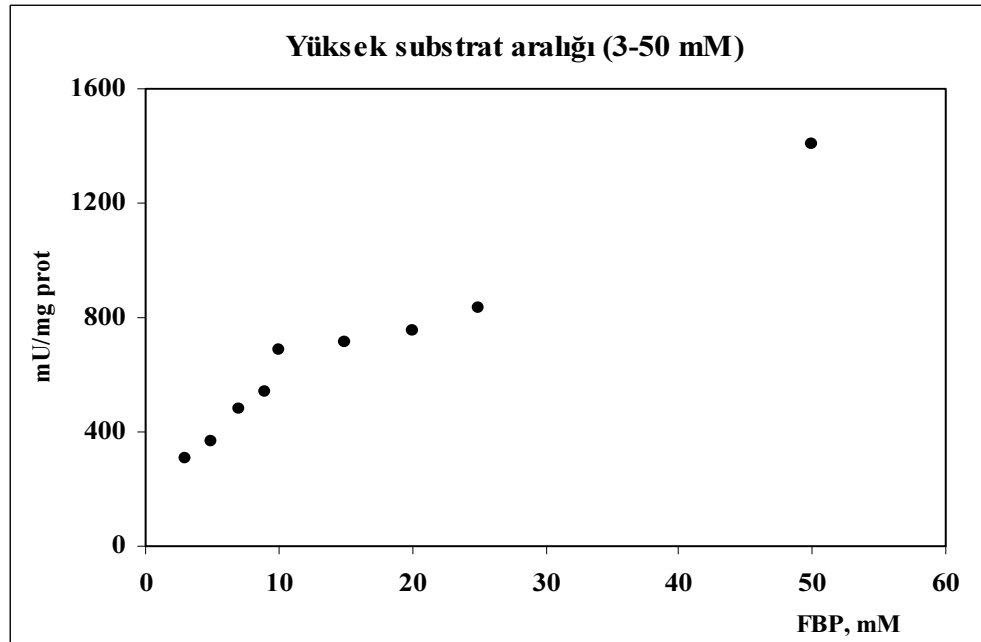
yüksek substrat aralığında grafiklemenin hiperbole daha yakın karakterde olduğu gözlemlendi.



Şekil 4.3.2.1a: Tüm FBP derişimlerinin sağlıklı plasental aldolaz üzerine etkisi (FBP için Michaelis-Menten Grafiği).

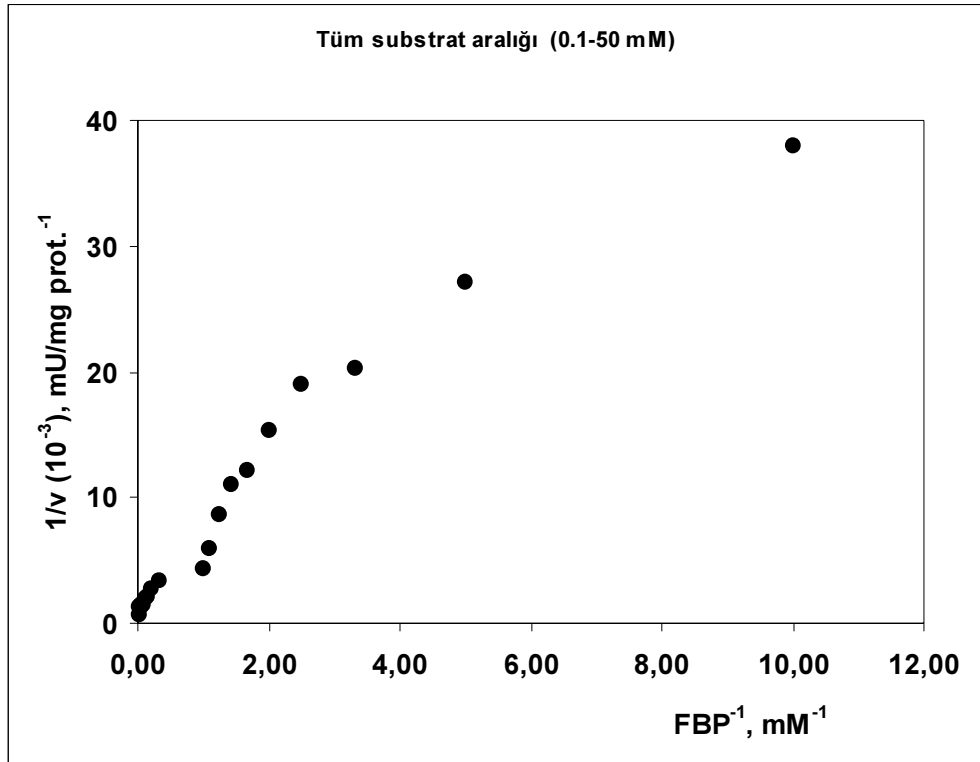


Şekil 4.3.2.1b: Düşük substrat derişimlerinin (0.1-0.3 mM) sağlıklı plasental aldolaz üzerine etkisi.



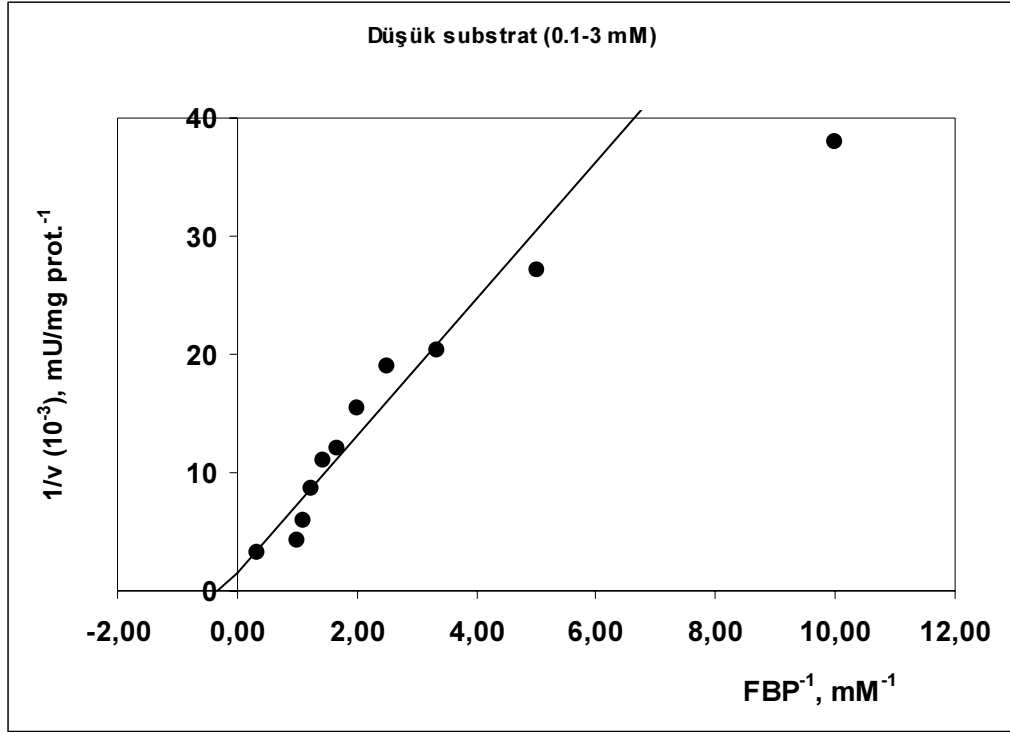
Şekil 4.3.2.1c: Yüksek substrat derişimlerinin (3-50 mM) sağlıklı plasental aldolaz üzerine etkisi.

Çalışılan tüm FBP derişimlerinin kullanılmasıyla çizilen Lineweaver-Burk grafiği Şekil 4.3.2.1d'de görülmektedir. Buna göre enzimin sağlıklı insan plasental FBPA'nın V_m değeri $1769,513 \pm 200,322$ iken, K_m değeri, $20,003 \pm 4,497$ mM olarak hesaplandı.

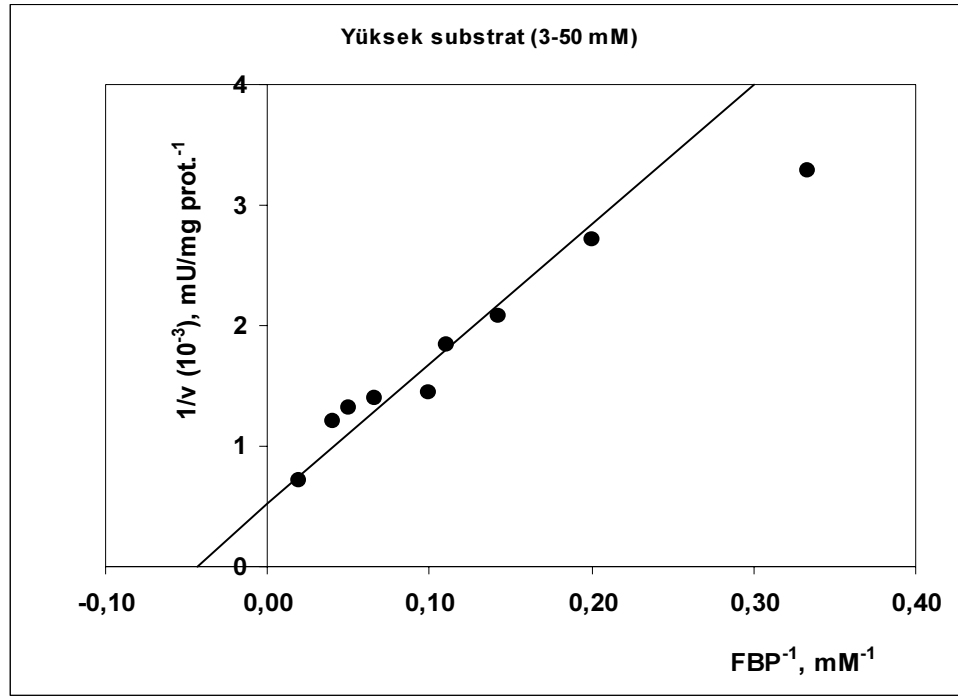


Şekil 4.3.2.1d: Tüm FBP derişimleri için Lineweaver-Burk grafiği (Sağlıklı plasental aldolaz zerine).

Enzimin, tüm substrat derişimleri kullanılarak çizilen Lineweaver-Burk grafiklemesinde doğrunun aşağıya doğru kıvrıldığı gözlendi. Bu kıvrılmanın olduğu noktadan ayrılan fazlar için iki ayrı grafikleme daha yapıldı. Buna göre, düşük (4.3.2.1e) ve yüksek (4.3.2.1f) derişimlerdeki substrat aralığlarının ayrı ayrı grafikleri çizildi.



Şekil 4.3.2.1e: Düşük FBP derişimleri için Lineweaver-Burk grafiği (Sağlıklı plasental aldolaz).



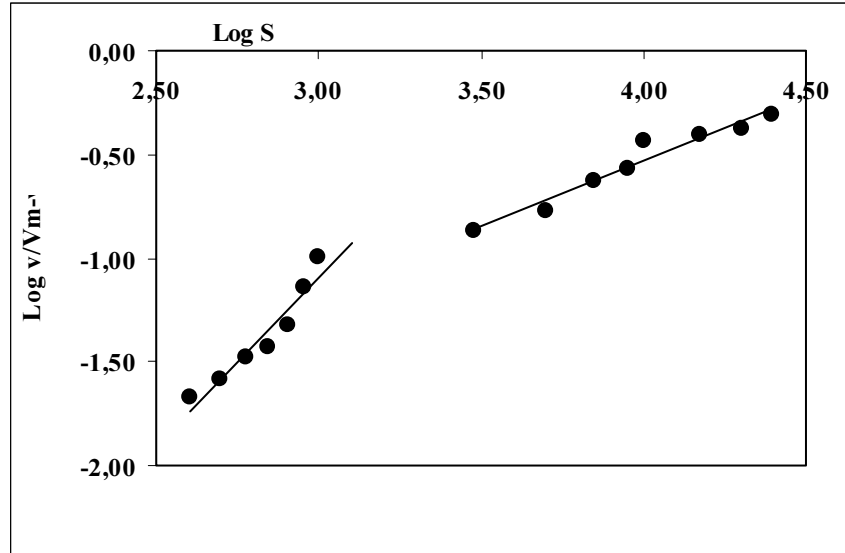
Şekil 4.3.2.1f: Yüksek FBP derişimleri için Lineweaver-Burk grafiği (Sağlıklı plasental aldolaz).

Bu grafiklere göre, sağlıklı plasental adolazın çalışılacağı lineer substrat derişimi bölgesi olarak, yüksek konsantrasyon aralığı olan 3-50 mM olarak seçildi ve ileri inhibisyon kinetiği çalışmaları bu lineer bölgede yapıldı.

Sağlıklı plasental aldolazın; Yüksek derişimlerinde (3-50 mM), K_m değeri $23,063 \pm 6,845$ mM ve V_m değeri $1885,457 \pm 292,48$ olarak hesaplandı. Düşük derişimde ise (0,1-3 mM), K_m değeri $3,048 \pm 1,39$ mM ve V_m ise $636,103 \pm 196,165$ olarak bulundu.

Enzimin, substratın derişimine bağlı olarak gösterdiği bu “bifazik” davranışın tam olarak anlaşılabilmesi için Hill plot grafiklemesi yapıldı (Şekil 4.3.2.1g). Bu grafikte de iki fazlı karakter açıkça görülmektedir. Enzim farklı substrat derişimlerinde farklı kinetik özellikler göstermektedir. Yani enzim, düşük substrat derişimde farklı yüksek derişimde farklı afiniteye sahiptir. Enzimin Lineweaver-Burk grafiklemesinde bu daha önce de gösterilmiştir. Lineweaver Burk’de iki ayrı K_m değeri elde edildi. Yüksek substrat derişimlerinde K_m değeri $23,063 \pm 6,845$ mM

olarak bulunurken, düşük derişimlerde bu değerin, $3,048 \pm 1,39$ mM olduğu hesaplandı.



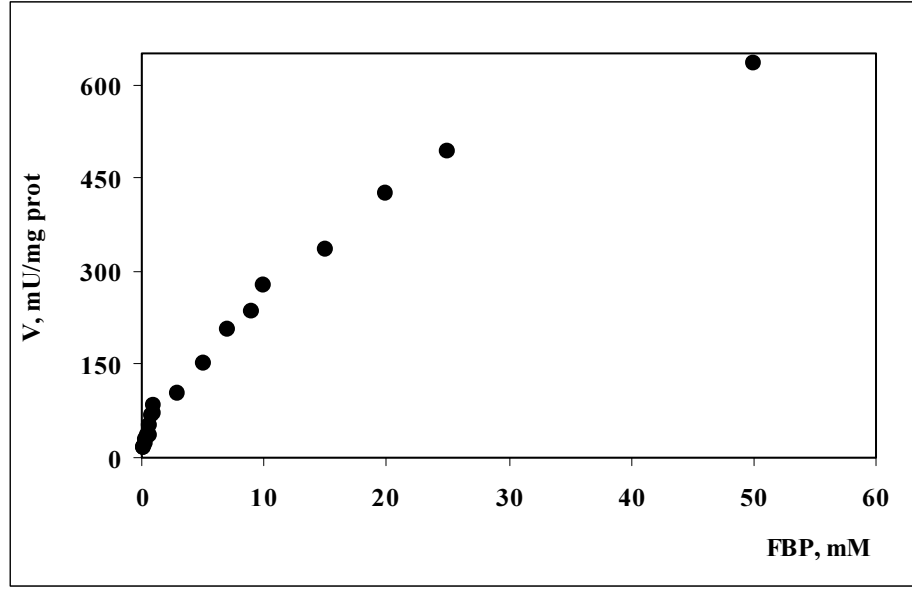
Şekil 4.3.2.1g: Sağlıklı plasental aldolaz'da FBP için Hill plot grafiklemesi.

Sağlıklı-plasental aldolaz'da Hill-plot eğimi, 3-50 mM substrat derişimlerinde: 0,73 olarak bulundu.

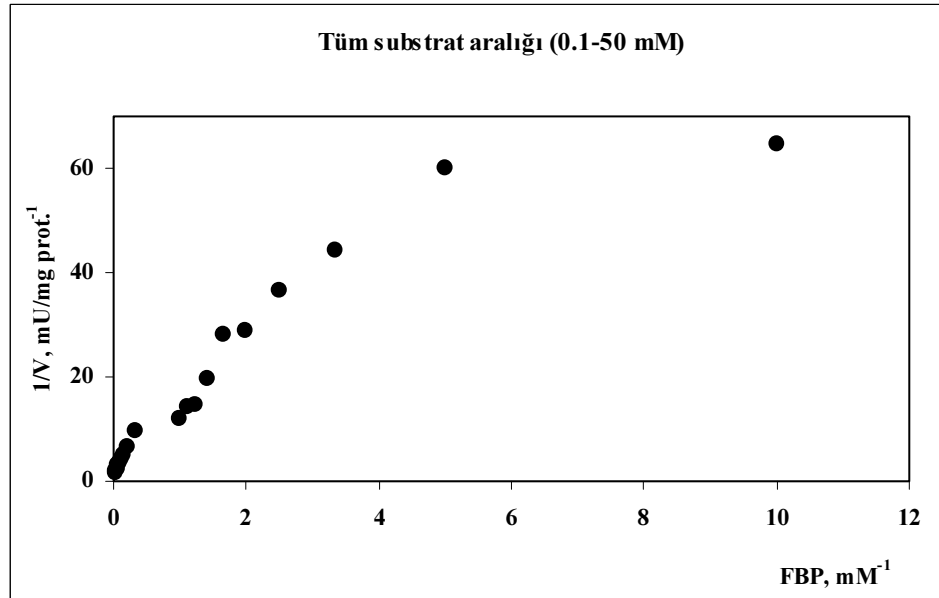
4.3.2.2. GDM'li İnsan Plasental Aldolazının Substrat Kinetiği

Gestasyonel diyabetik insan plasental FBPA'nın tüm substrat derişimleri için V_m 'i $939,548 \pm 60,869$ ve K_m 'i $24,304 \pm 2,948$ mM olarak hesaplanmıştır.

Ölçülen ilk hızların, çalışılan tüm substrat derişimlerine karşı grafiklenmesi ile, Michaelis-Menten grafiği çizildi (Şekil 4.3.2.2a). Tüm substratlarla çizilen Michaelis-Menten grafiklemesinde, iki ayrı faz gözlenmedi. Michaelis-Menten eğrisinin "bifazik" olmaması nedeniyle, farklı derişimlerdeki substratlara göre MM grafiklemesi yapılmadı.

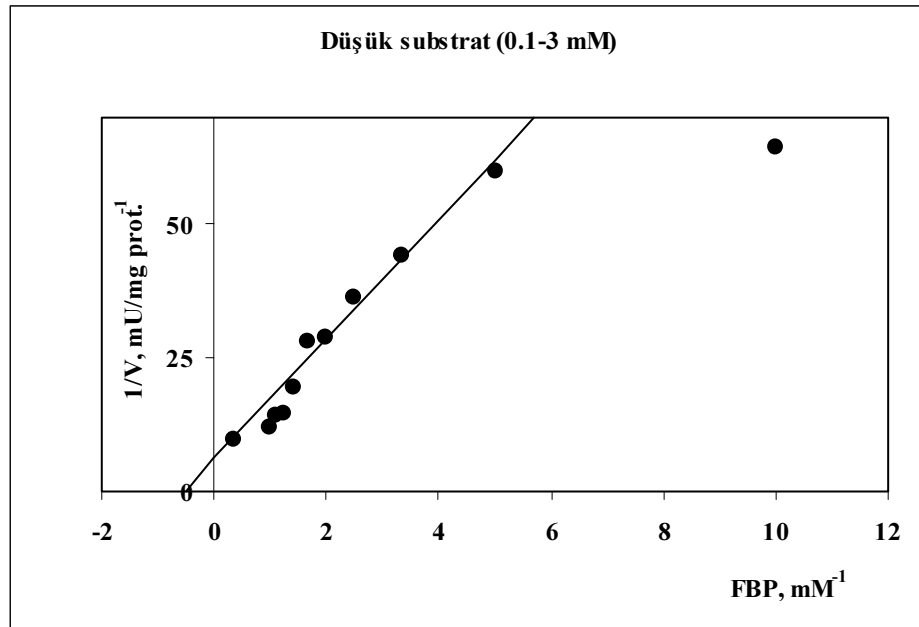


Şekil 4.3.2.2a: Tüm FBP derişimlerinin GDM plasental aldolaz üzerine etkisi (FBP için Michaelis-Menten Grafiği).

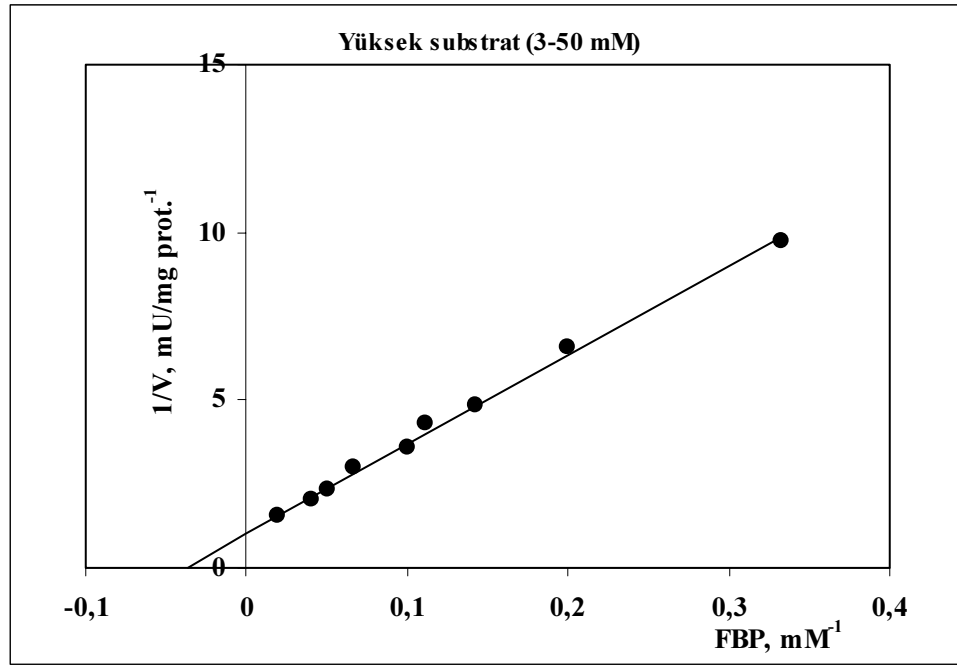


Şekil 4.3.2.2b: Tüm FBP derişimleri için Lineweaver-Burk grafiği (GDM plasental aldolaz).

Enzimin farklı substrat ve inhibitör derişimleri kullanılarak yapılan kinetik deneyler sonucunda, Lineweaver-Burk doğrularının lineerlikten saparak, kıvrıldığı gözlemlendi. Bu kıvrılmanın olduğu noktadan ayrılan fazlar için iki ayrı grafikleme daha yapıldı. Düşük substrat (4.3.2.2c) ve yüksek substrat derişimleri (4.3.2.2d) için çizilen Lineweaver-Burk grafiklemeleri aşağıda görülmektedir.



Şekil 4.3.2.2c: Düşük FBP derişimleri için Lineweaver-Burk grafiği (GDM plasental aldolaz).

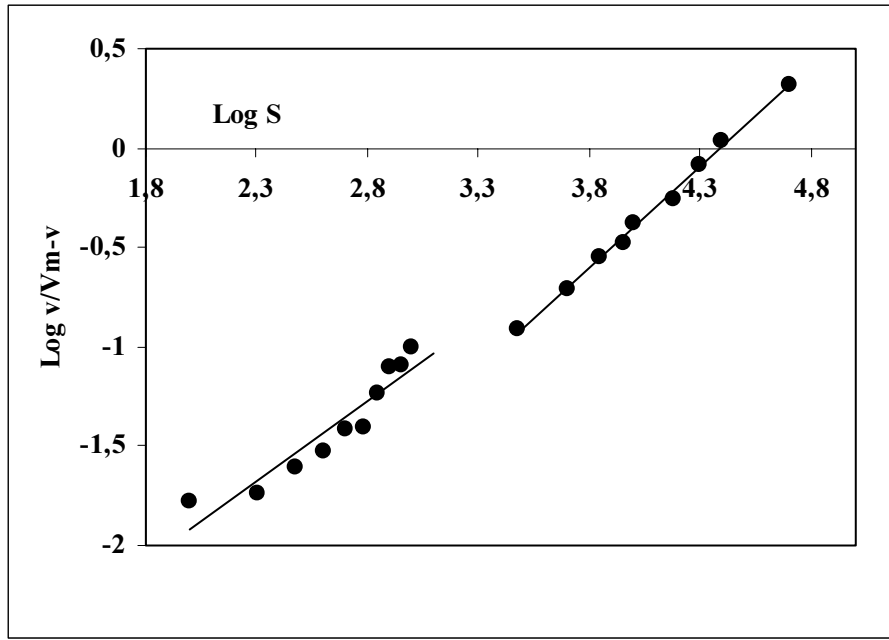


Şekil 4.3.2.2d: Yüksek FBP derişimleri için Lineweaver-Burk grafiği (GDM plasental aldolaz).

Bu grafiklere göre, GDM plasental adolazın çalışılacağı lineer substrat derişimi bölgesi olarak, yüksek konsantrasyon aralığı olan 3-50 mM olarak seçildi ve ileri inhibisyon kinetiği çalışmaları bu lineer bölgede yapıldı.

Gestasyonel diyabetik plasental aldolazın; Yüksek substrat derişimlerinde (3-50 mM) V_m değeri $981,093 \pm 38,483$ ve K_m değeri $26,686 \pm 1,913$ mM olarak hesaplandı. Düşük derişimde ise (0,1-3 mM), V_m $159,422 \pm 26,180$ ve K_m değeri ise $1,385 \pm 0,403$ mM olarak bulundu.

Enzimin, substratın derişimine bağlı olarak gösterdiği bu davranışın tam olarak anlaşılabilmesi için ayrıca, Hill plot grafiklemesi yapıldı (Şekil 4.3.2.2e). Gestasyonel diyabetik plasental aldolazın, Hill-plot eğimi 0,97 olarak hesaplandı.



Şekil 4.3.2.2e: GDM plasental aldolaz'da FBP için Hill plot grafiklemesi.

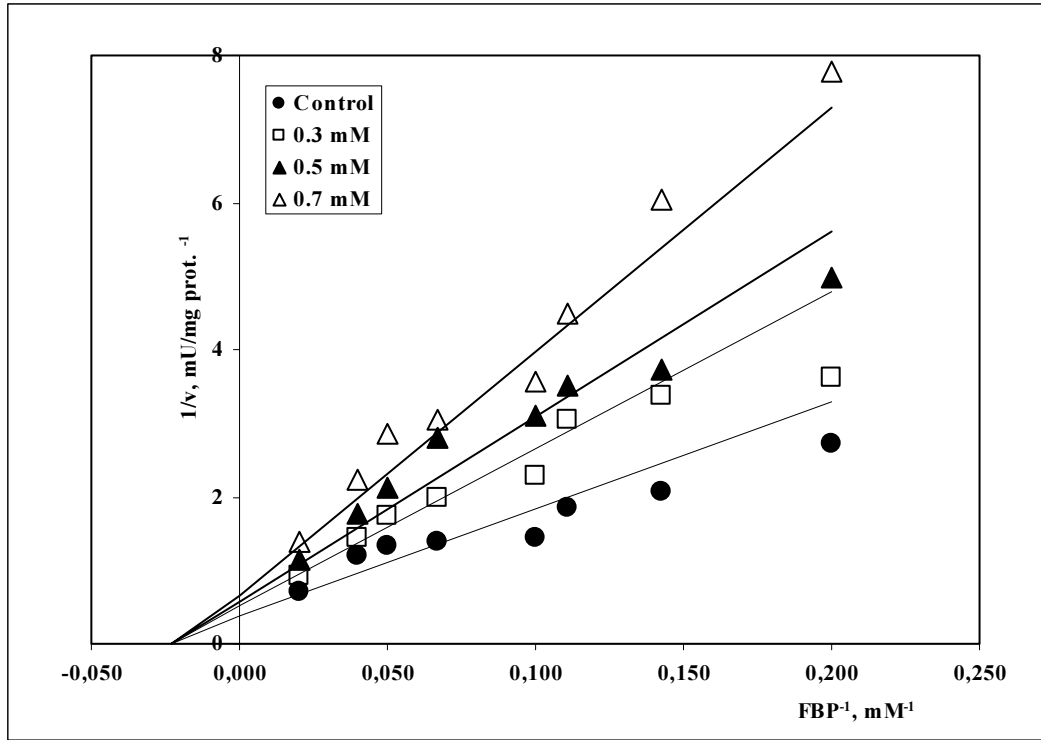
Bu grafikte de, enzimin bifazik özellikte olduğu görülmektedir. Hill plot grafiklemesine göre, enzimin farklı substrat derişimlerinde farklı kinetik özellikler gösterdiği bulundu.

4.3.2.3. Sağlıklı İnsan Plasental Aldolazının İnhibitör Kinetiği

Sağlıklı insan plasental aldolazının inhibisyon kinetiği çalışmaları, DHAP, ATP ve Mg^{+2} ile yapıldı. Substrat derişimleri önceki deneylerde saptanan lineer aralıkta çalışıldı. Systat 11 nonlinear regresyon modülündeki inhibisyon modellemeleri ile inhibisyon kinetiklerinin tipleri belirlendi.

4.3.2.3a. Sağlıklı İnsan Plasental Aldolazın DHAP Kinetiği

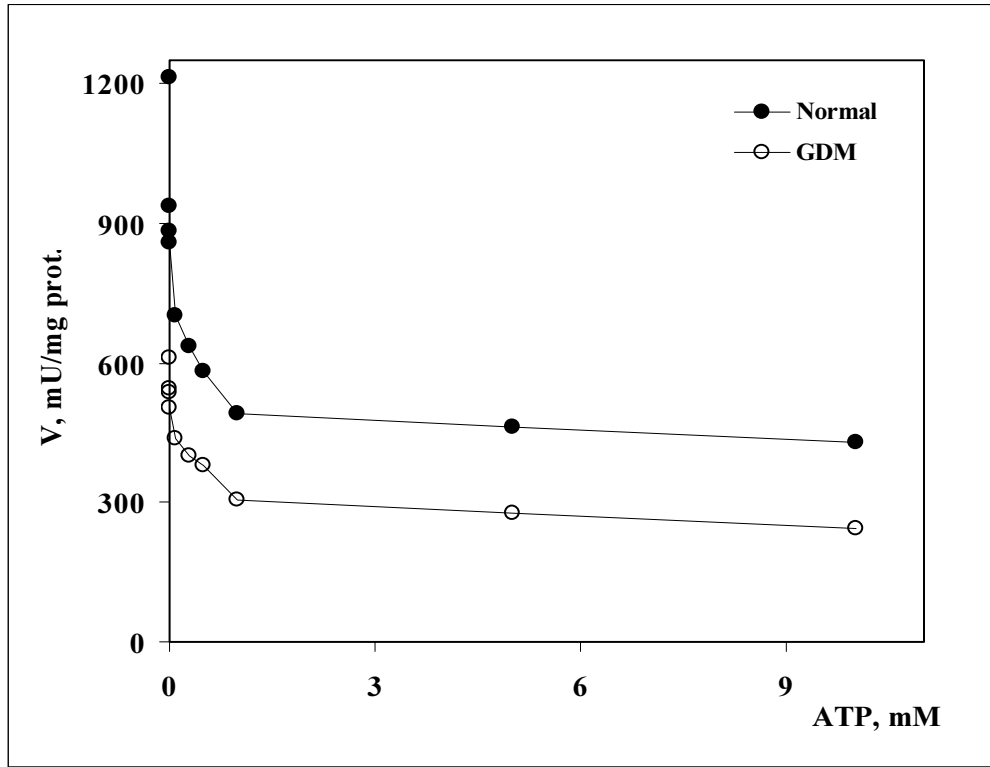
DHAP'ın sağlıklı insan plasental Aldolazı üzerine inhibisyon etkileri incelendi. DHAP'ın, sağlıklı insan plasental aldolazının non-kompetitif inhibitörü olduğu bulundu. DHAP'ın K_i değeri, $1,039 \pm 0,107$ mM olarak hesaplandı. Şekil 4.3.2.3a'da grafiklendi:



Şekil 4.3.2.3a: DHAP'ın sağlıklı insan plasental aldolazı üzerine etkisi.

4.3.2.3b. Sağlıklı İnsan Plasental Aldolazın ATP Kinetiği

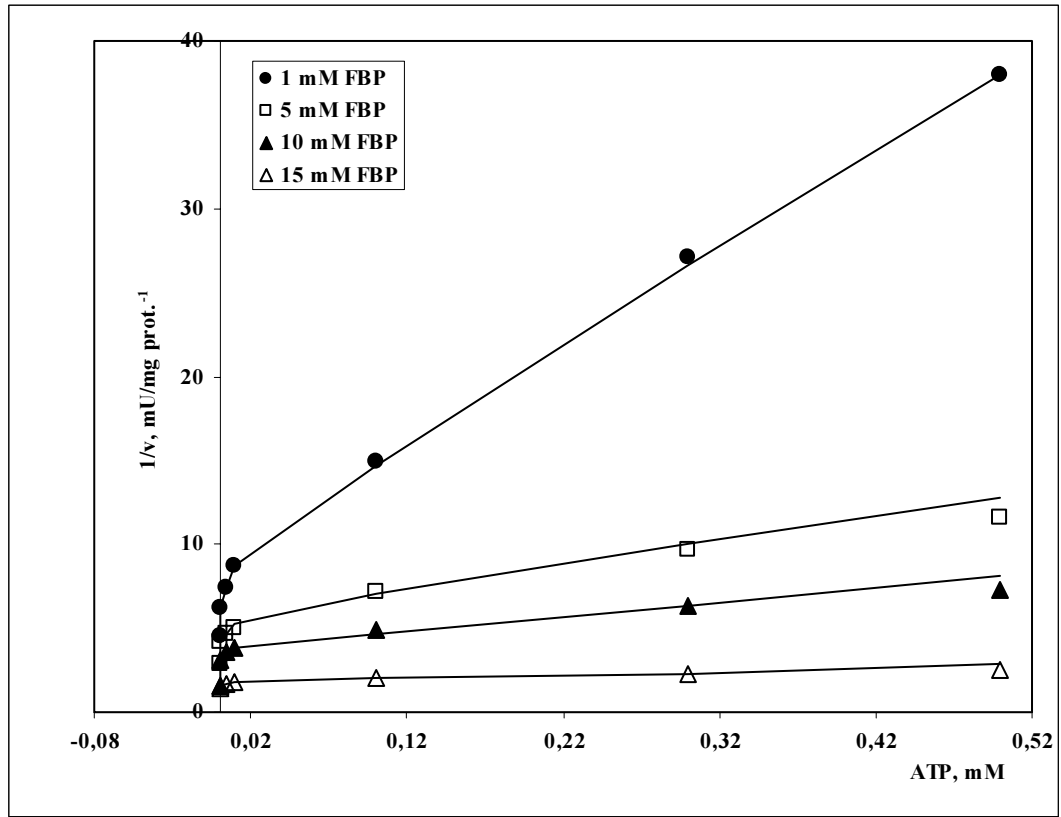
ATP ile inhibisyon kinetiği çalışmasının ilk bölümünde, artan inhibitör derişimlerine karşı sabit substrat derişiminde ilk hızlar ölçülerek V değerlerine karşı inhibitör derişimleri grafiklendi. Buna göre, hızların sıfırlanmadığı ve limit bir değerde kaldığı görüldü. Çalışmamızda, her iki plasentadan saflaştırdığımız aldolazların, sabit substrat ve değişen inhibitör derişimlerinde hızın sıfırlanmadığı bulundu. Buna göre, ATP inhibisyonunun, her iki enzim için de “partial kompetitif” olduğu gözlemlendi (Şekil 4.3.2.3b1).



Şekil 4.3.2.3b1: 50 mM FBP derişiminde, ATP'nin sağlıklı ve gestasyonel diyabetik insan plasental FBPA'larına etkisi.

ATP'nin plasental aldolaz üzerine olası inhibisyon etkilerinin incelendiği bu bölümde ayrıca, Dixon grafiklemesi yapıldı. Burada, $1/V$ değerlerine karşı inhibitör derişimleri grafiklendi.

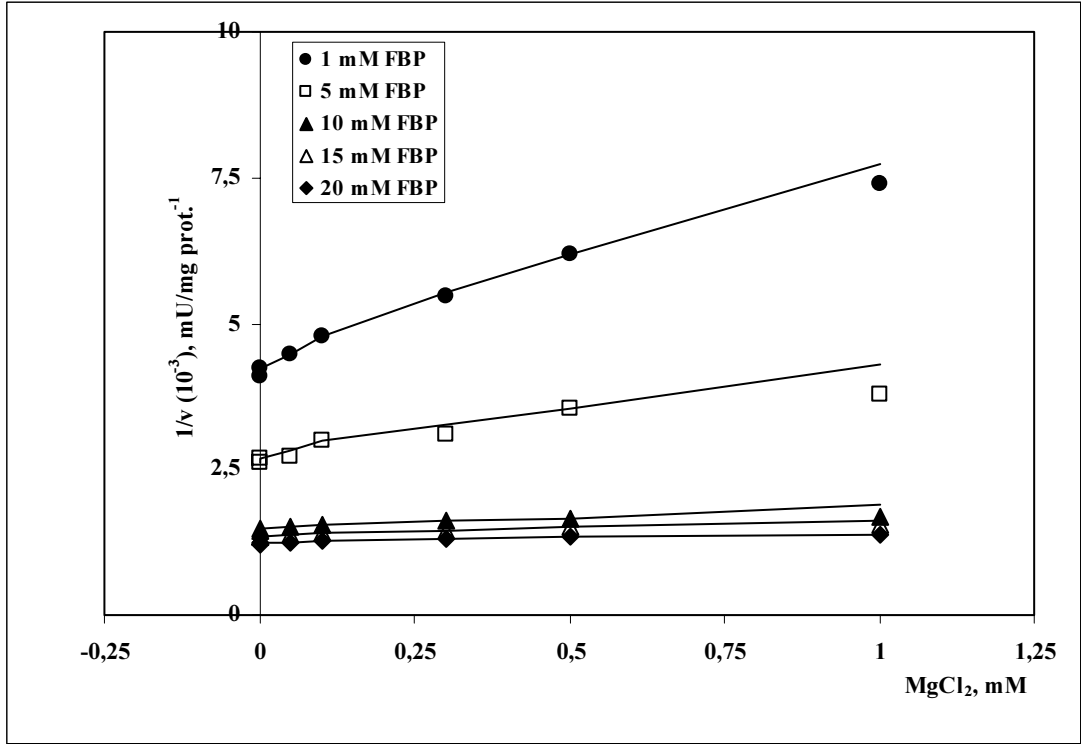
Systat 11 nonlinear regresyon modülündeki inhibisyon modellemeleri sonucu, ATP'nin, sağlıklı insan plasental aldolazının "partial-kompetitif" inhibitörü olduğu saptandı. ATP'nin K_i değeri $0,074 \pm 0,026$ mM ve α katsayısı $3,287 \pm 0,434$ olarak bulundu.



Şekil 4.3.2.3b2: ATP'nin sağlıklı insan plasental aldolazı üzerine etkisinin Dixon Grafiği.

4.3.2.3c. Sağlıklı İnsan Plasental Aldolazın Mg^{+2} Kinetiği

Çalışmanın bu bölümünde sağlıklı insan plasental aldolazının iki değerlikli metal olan Mg^{+2} ile etkileşimi incelenerek, inhibisyon etkileri araştırıldı. İnhibitörlü ortamda elde edilen doğrular, Mg^{+2} 'un sağlıklı plasental enzimin kompetitif inhibitörü olduğunu gösterdi. K_i değeri hesaplandığında, “pure-kompetitif” inhibisyon yaptığı bulundu. Systat 11 nonlineer regresyon modülündeki inhibisyon modelleri ile, K_i $14,678 \pm 2,702$ mM olarak hesaplandı. Buna ait grafik, şekil 4.3.2.3c'de gösterildi. Şekilde de görüldüğü gibi, kontrol ve inhibisyon doğrularının 1/V ekseninde kesiştiği gözlemlendi ve inhibisyon tipi onaylandı.



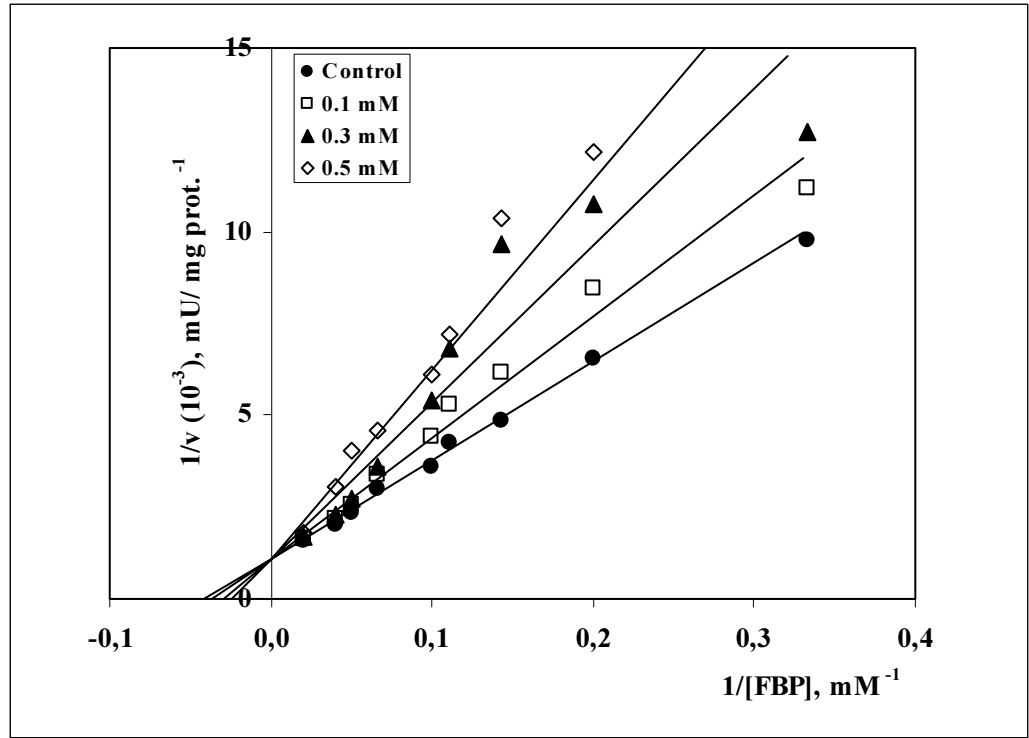
Şekil 4.3.2.3c: Mg⁺² un sağlıklı insan plasental aldolazı üzerine etkisi.

4.3.2.4. GDM İnsan Plasental Aldolazının İnhibitör Kinetiği

GDM insan plasental aldolazının inhibisyon kinetiği çalışmaları, DHAP, ATP ve Mg⁺² ile gerçekleştirildi. Substrat derişimleri önceki deneylerde saptanan lineer aralıkta çalışıldı. Systat 11 nonlinear regresyon modülündeki inhibisyon modelleri ile inhibisyon kinetiklerinin tiplerini belirlendi.

4.3.2.4a. GDM İnsan Plasental Aldolazın DHAP Kinetiği

DHAP'ın GDM insan plasental Aldolazı üzerine inhibisyon etkileri incelendi. DHAP'ın, gestasyonel diyabetik insan plasental aldolazının kompetitif inhibitörü olduğu bulundu. Ki değeri, 0,766±0,035 mM olarak hesaplandı. İnhibisyon kinetiği Şekil 4.3.2.4a'da grafiklendi:



Şekil 4.3.2.4a: DHAP'ın GDM insan plasental aldolazı üzerine etkisi.

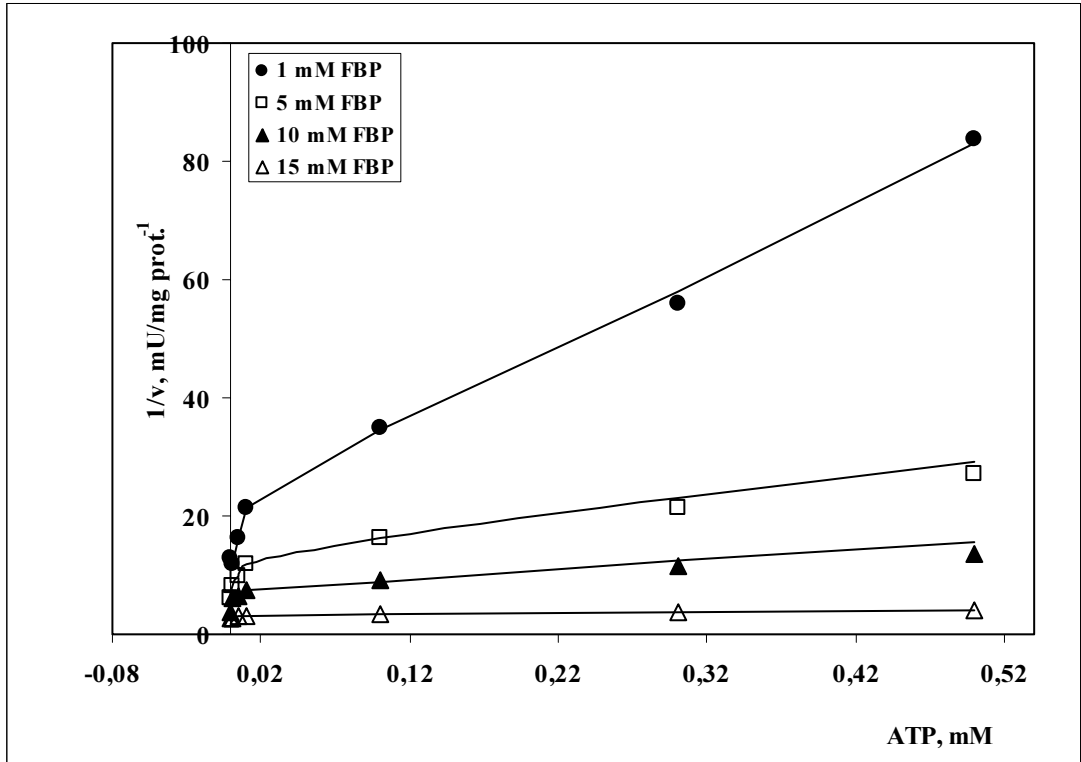
Grafikte de görüleceği gibi DHAP, GDM aldolazın kompetitif inhibitörü olduğu bulundu. Kontrol ve inhibisyon doğrularının 1/V ekseninde kesiştiği gözlemlendi ($K_i = 0,766 \pm 0,035$ mM).

4.3.2.4b. GDM İnsan Plasental Aldolazın ATP Kinetiği

ATP ile inhibisyon kinetiği çalışmasının ilk bölümünde, artan inhibitör derişimlerine karşı sabit substrat derişiminde ilk hızlar ölçülerek V değerlerine karşı inhibitör derişimleri grafiklendi (Şekil 4.3.2.3b1). Yapılan bu grafikde hızların sıfırlanmadığı ve limit bir değerde kaldığı görüldü. Çalışmamızda, her iki plasentadan saflaştırdığımız aldolazların, sabit substrat ve değişen inhibitör derişimlerinde hızın sıfırlanmadığı bulundu. Buna göre, ATP inhibisyonunun, her iki enzim için de “partial kompetitif” olduğu gözlemlendi.

ATP'nin diyabetik insan plasental aldolaz üzerine olası inhibitör etkilerinin incelendiği bu bölümde ayrıca, Dixon grafiklemesi yapıldı. Burada, 1/V değerlerine

karşı inhibitör derişimleri grafiklendi (Şekil 4.3.2.4b). Systat 11 nonlineer regresyon modülündeki inhibisyon modellemeleri sonucu, ATP'nin, gestasyonel diyabetik insan plasental aldolazının "partial-kompetitif" inhibitörü olduğu saptandı. K_i , ($0,136 \pm 0,049$ mM) değeri α katsayısı kadar ($4,089 \pm 0,539$) etkilenmektedir. Bu verinin grafiği, şekil 4.3.2.4b'de gösterildi:

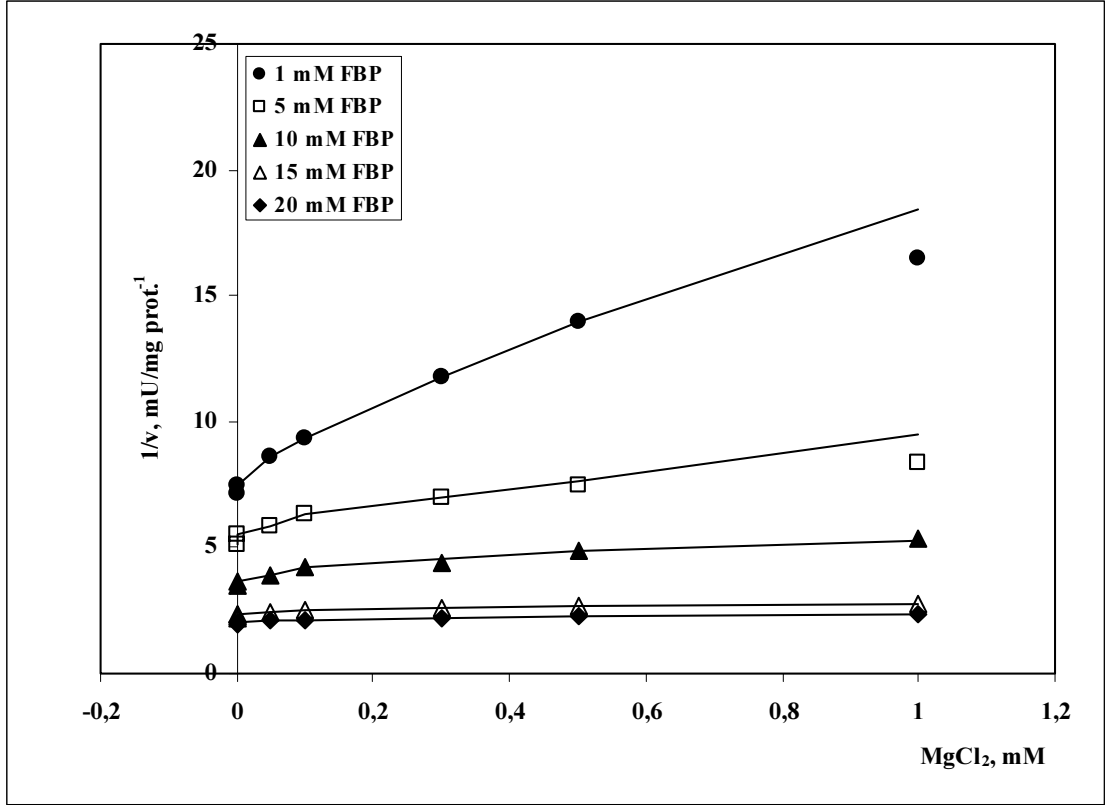


Şekil 4.3.2.4b: ATP'nin gestasyonel diyabetik insan plasental aldolazı üzerine etkisinin Dixon Grafiği.

4.3.2.4c. GDM İnsan Plasental Aldolazın Mg^{+2} Kinetiği

Çalışmanın bu bölümünde diyabetik insan plasental aldolazının iki değerlikli metal olan Mg^{+2} ile etkileşimi incelenerek, inhibisyon etkileri araştırıldı. İnhibitörlü ortamda elde edilen inhibisyon doğruları ile, Mg^{+2} 'un GDM plasental enziminin "partial-kompetitif" inhibitörü olduğu bulundu. K_i değeri hesaplandığında, bu inorganik iyonun, GDM plasental enzimi üzerinde "partial-kompetitif" inhibisyon

yaptığı bulundu. Ki değeri, $0,218 \pm 0,113$ mM ve α katsayısı, $1,676 \pm 0,118$ olarak hesaplandı. Buna ait grafik, şekil 4.3.2.4c’de gösterildi:



Şekil 4.3.2.4c: Mg^{+2} un GDM insan plasental aldolazı üzerine etkisi.

TARTIŞMA

Fruktoz 1,6 BP Aldolaz, glikoliz yolunda kavşak noktası olan bir basamağın sonunda bir mol heksozdan iki mol üç karbonlu metabolitlerin (DHAP, GA3P) oluşumunu katalizleyen önemli bir glikolitik enzimdir. Tüm vücut dokularında, farklı izozimleriyle özelleşmiş olarak yerleşiktir (1-6). Primatlarda eksikliklerine veya aktivite düşüklüklerine bağlı olarak, tanımlanmış metabolik hastalıklar olduğu bilinmektedir. Bu hastalıkların araştırılması ve tedavilerine yönelik çalışmaların genişletilmesi ile başlanan araştırmalar sonunda enzimin dokuya has farklılıkları ve katalitik karakterizasyonları hızla aydınlatılmaktadır. Aldolaz enzimleri, substratını bölme mekanizmalarına göre de canlılar arasında birçok farklılıklarıyla hala geniş bir araştırma konusudur (3-18).

Literatürde aldolazın özellikle gestasyonel diyabetik insan plasentasından saflaştırıldığına dair bir bilgi bulunmamaktadır. Bu çalışmada öncelikli olarak, sağlıklı ve gestasyonel diyabetli insan plasentalarında aldolazın varlığı gösterilmiştir.

Yapılan çalışmada, Penhoet'in yönteminde (37) seçilen amonyum sülfat kesitlemesi aralığı % 45-65 olarak değiştirilmiştir (Şekil 4.1). Şekilde de görülebileceği gibi, aktivitenin en yüksek olduğu bölge seçilerek amonyum sülfat çöktürmeleri yapılmıştır. Bu yöntemle, sağlıklı insan plasentasından 40.5 (Tablo 4.1.1) ve diyabetli insan plasentasından 63 kez (Tablo 4.1.2) saflaştırma oranı ile enzim elde edildi. Normal insan plasental aldolazının fosfoelüzyon grafiği Şekil 4.1.1'de, diyabetli insan plasentasına ait aldolazın fosfoelüzyon grafiği ise Şekil 4.1.2'de gösterilmiştir. Her iki dokudan da enzimler, kolona substratın bağlanmasıyla elüe edildi. Her iki elüzyon profilinde enzimin saf iki ayrı zirve halinde geldiği saptandı. Modifiye edilerek esas alınan literatürden farklı olarak, enzimin iki ayrı zirvede gelmesinin, plasental aldolaza has bir özellik olduğu düşünülmektedir.

Normal insan plasentasında spesifik enzim aktivitesi 831.90 mU/mg protein olarak, diyabetli insan plasentasında ise spesifik aktivite 590.94 mU/mg protein

olarak saptandı. Deneyle sonucunda, normal ve diyabetli plasental aldolazın aktivitesindeki farkın, diyabetik komplikasyonlardan kaynaklanan önemli bir faktör olabileceği düşünülmektedir. Gestasyonel diyabetik plasentadan saflaştırılan enzimin aktivitesindeki %29 oranındaki düşüşün, gestasyonel diyabetin dokuda yarattığı hasara ve olası konformasyonel değişikliklere bağlı olduğunu düşündürmektedir.

Hem sağlıklı hem de diyabetli örneklerin SDS-poliakrilamid jel elektroforezi sonuçları Şekil 4.2.1a ve 4.2.1b'de gösterildi. Saf enzim elektroforeze uygulandıktan sonra, tek bir bant gözlemlendi. Bandın tavşan kası aldolazı ile, elektroforetik ortamda benzer olarak hareket ettiği tespit edildi. Elektroforetik deneyler sonucunda, insan plasental aldolazının molekül ağırlığının, tavşan kas aldolazına benzer olarak 160.000 Da (homotetramer) saptandı (Şekil 4.2.1c).

Aktivite yöntemindeki koşulların optimizasyonu incelenerek, enzimin en iyi aktivite gösterdiği koşullar bulundu. Saflaştırılan insan plasental aldolazların optimum pH'larını saptamak amacıyla, pH değerleri 5.0~8.5 arasında TEA-EDTA tamponları hazırlandı. Buna göre, pH 7.4'ün (Şekil 4.3.1.1a ve Şekil 4.3.1.1b) her iki enzimin aktivitesi için optimum koşul olduğu saptandı. Çeşitli insan dokularından saflaştırılan aldolazın optimum pH değeri 7,4 olarak belirtilmiştir. Bu bulgumuz literatürle uyumludur (35, 37).

Plasental aldolaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisinin araştırıldığı deneyde, 10~60 °C arasında değişen değerlerde enzim inkübe edildi. Sıcaklık değerine karşılık ölçülen aktivite değerleri grafiklenerek, sağlıklı ve diyabetik insan plasental aldolazının optimum sıcaklığı 37 °C olarak doğrulandı (Şekil 4.3.1.2a ve Şekil 4.3.1.2b). Bu bulgumuz da literatürle uyumlu bulunmuştur (35, 37).

Enzim aktivite ölçüm yöntemi (35) için seçilen inkübasyon zamanı (Şekil 4.3.1.3a ve Şekil 4.3.1.3b) ve spektrofotometrik okuma sürelerinin (Şekil 4.3.1.4a ve Şekil 4.3.1.4b) optimize edilmesi ile en verimli çalışma ortamı oluşturuldu. Enzim aktivite tayini yönteminde uygulanan, 37 °C'lik inkübasyon 0~60. dakikalarda yapıldı. 37 °C'de inkübasyon hem sağlıklı (Şekil 4.3.1.3.a), hem de gestasyonel diyabetli insan plasental aldolazı (Şekil 4.3.1.3.b) için maksimum absorbans ve maksimum aktivitenin sağlandığı süre belirlendi. Bu çalışmaya göre inkübasyon için optimum süre, 30 dakika olarak saptanmıştır.

Enzimatik ölçüm yönteminin son aşaması olan hidrazon oluşumunu takip eden bekleme süresinin optimizasyonu için 0~60 dakikalar sonrasında okumalar yapıldı. Sağlıklı insan plasentasından saflaştırılan aldolaza ait okuma sürelerine göre elde edilen grafikte (Şekil 4.3.1.4a) oluşan renk 0. ile 5. dakikalarda kararlı iken, bekleme sürelerinin uzamasına bağlı olarak, okuma değerlerinin düştüğü saptandı. Benzer olarak, gestasyonel diyabetli insan plasental aldolazı için de değerler 0. ile 5. dakikalarda değişmez iken, bekleme sürelerinin uzamasıyla değerlerde azalma olduğunu belirlendi (Şekil 4.3.1.4b). Bu sayede, ortam şartlarına bağlı olarak oluşabilecek aktivite kayıplarının en aza indirilmesi sağlanmış oldu.

Araştırmanın sonraki aşamalarında enzimin kinetik parametreleri çalışıldı. FBP için kinetik parametrelerin hesaplanmasında; her iki enzimde çalışılan tüm substrat derişimleri için elde edilen aktivite değerleri, Systat 11 istatistik programının nonlinear regresyon modülü ile analiz edildi.

Enzimin substrat kinetiği inhibitörsüz ortamda yapıldı. Ölçülen ilk hızların, farklı substrat derişimlerine karşı değişik grafiklemeleri yapıldı. Enzimatik tepkime hızı/substrat derişimini ifade eden Michaelis-Menten grafikleri çizildi (Şekil 4.3.2.1a, Şekil 4.3.2.2a). Her iki enzim için de sırasıyla verilen grafiklerde de görüleceği gibi, enzimin substrata olan davranışında birden fazla faz olduğu gözlenmektedir.

Çalışılan tüm FBP derişimlerinin kullanılmasıyla çizilen sağlıklı plasental aldolaza ait Lineweaver-Burk grafiği şekil 4.3.2.1d'de görülmektedir. İstatistiksel analiz sonucu, enzimin sağlıklı insan plasental FBPA'nın V_m değeri $1769,513 \pm 200,322$ ve K_m değeri, $20,003 \pm 4,497$ mM olarak hesaplandı. Enzimin farklı fazları, Lineweaver-Burk grafiklemesinde doğrunun aşağıya doğru kıvrılması ile de gözlemlendi. Bu kıvrılmanın olduğu noktadan ayrılan fazlar için iki ayrı grafikleme ve kinetik parametre hesabı yapıldı (4.3.2.1e-f).

Sağlıklı plasentadan saflaştırılan enzimin; düşük derişimde (0,1-3 mM) K_m değeri $3,048 \pm 1,39$ mM ve V_m ise $636,103 \pm 196,165$ olarak bulundu. Yüksek derişimler de ise (3-50 mM) V_m değeri $1885,457 \pm 292,48$ ve K_m değeri $23,063 \pm 6,845$ mM olarak hesaplandı.

Enzimin substratın derişimine bağlı olarak gösterdiği bu "bifazik" davranışın daha iyi anlaşılabilmesi için Hill plot grafiklemesi yapıldı (Şekil 4.3.2.1g). Buna göre, enzimin farklı substrat derişimlerinde farklı kinetik özellikler gösterdiği

görülmektedir. Yani enzimin, düşük substrat derişiminde farklı, yüksek substrat derişiminde farklı afiniteye sahip olduğu bulundu.

Allosterik enzimler, genellikle “bifazik” karakter göstermektedirler. Literatürde bazı enzimlerin inhibitörlerine karşı allosterik özellik gösterdikleri bildirilmektedir. Sitokrom P-450 enzimleri ile yapılan bir çalışmada enzimin bifazik karakterde olduğu belirtilmektedir. Bu çalışmada farklı substratlarla kinetikleri çalışılmış ve bifazik karakterde hız eğrileri elde edilmiş ve Hill sabitleri 1'in üzerinde olduğundan pozitif kooperativite gösterdikleri bildirilmiş, substratın yüksek ve düşük derişimlerinde enzimin farklı afiniteler gösterdiği belirtilmiştir (55).

Allosterik enzimler, kooperatif olarak çalışan sistemlerdir. Bu sistemler, substrat, inhibitör ya da aktivatör konsantrasyonlarındaki değişikliklere bağlı olarak hızda oldukça büyük değişiklikler gösterirler. V-S grafikleri hiperbolik olmaz. Sigmoidal hız eğrileri vardır. Ligand bağlanmasına bağlı olarak enzimde konformasyonel değişiklikler olmaktadır. Efektörlerin enzime bağlanıp aktif bölgenin katalitik özelliklerini değiştirmesi pozitif ya da negatif yönde olabilir. Çoğu allosterik enzim oligomerik yapıda olup çok sayıda aktif alt birime sahiptirler. Genellikle metabolik yolların özellikle dallanma noktalarındaki reaksiyonlarını katalizlerler. Çok sayıdaki alt birim katalitik olarak aktiftir ve birden fazla substrat bağlayabilir. Bir substratın bağlanması, diğerlerinin bağlanmasını etkiler. Enzimin substratına ve substrat konsantrasyon derişimlerine bağlı olarak, enzimin afinitesinde farklılıklar görülür (48).

Fruktoz 1,6 bisfosfat aldolaz, glikolizin kavşak noktasını katalizleyen allosterik bir enzimdir (3-15). Yaptığımız substrat kinetiği çalışmaları ile elde ettiğimiz sonuçlarda gözlenen bifazik davranışlar, allosterik enzimlerin farklı substrat derişimlerinde gösterdiği farklı afiniteleri açıklamaktadır. İlk substratın bağlanmasını takiben enzimde oluşan konformasyonel değişiklik birden fazla var olan katalitik alt birimlerin diğer substratları bağlanmasını etkileyebilir. Hill-plot eğimlerinin her iki enzimde de 1'in altında çıkması nedeniyle, substrat bağlanma bölgelerinde negatif kooperatif etki gösterdiği öngörülmektedir. Enzimin homo-tetramerlerden oluştuğu, bu alt birimlerin substratın bağlanmasını takip eden konformasyonel derişimler geçirdiği düşünülmektedir. Ayrıca substratın derişimi arttıkça, enzimin substratına olan afinitesinin azaldığı, substrat derişimi azaldıkça enzim afinitesinin arttığı

gözlenmiştir. Homo-dimer oluşumundan sonraki homo-trimer ve homo-tetramer formasyonlarının kazanılmasında enzimimizin negatif kooperatif özellik gösterdiği düşünülmektedir. Diğer bir deyişle, ilk substrat bağlandıktan sonra diğerlerinin bağlanması konformasyonel değişimden dolayı zorlaşmaktadır (48).

Gestasyonel diyabetik insan plasental FBPA'nın tüm substrat derişimleri için V_m 'i $939,548 \pm 60,869$ ve K_m 'i $24,304 \pm 2,948$ mM olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.3.2.2b). Gestasyonel diyabetik plasental aldolazın; yüksek derişimlerinde (3-50 mM) V_m değeri $981,093 \pm 38,483$ ve K_m değeri $26,686 \pm 1,913$ mM olarak hesaplandı (Şekil 4.3.2.2c). Düşük derişimde ise (0,1-3 mM), K_m değeri $1,385 \pm 0,403$ mM ve V_m ise $159,422 \pm 26,180$ olarak bulundu (Şekil 4.3.2.2d).

Elde edilen bu bulgular doğrultusunda, her iki enzim tipi ile ileri inhibisyon kinetiği çalışmaları lineer bölgede (3-50 mM arasında) yapıldı.

Enzimatik çalışmanın ikinci aşamasında, sağlıklı ve gestasyonel diyabetli insan plasental aldolazı üzerine DHAP, ATP ve Mg^{+2} 'un inhibisyon etkileri araştırıldı. Bu deneylerde substrat olarak FBP kullanıldı ve sadece lineer bölgede kinetik analiz yapıldı. Deneysel veriler Systat 11 istatistik programının non-lineer regresyon modülünde inhibisyon modellerine uyum üzerinden değerlendirildi ve verilere uygun olan kinetik davranış saptandı.

DHAP, aldolazın fruktoz 1,6 bisfosfat'ı parçalayarak oluşturduğu iki üründen biridir. DHAP ile yapılan kinetik çalışmalar, ürün inhibisyonu çalışmalarıdır. Bu tip incelemeler allosterik enzimlerin karakterizasyonu açısından önem taşırlar. Sağlıklı ve diyabetik insan plasental aldolazının inhibisyon kinetiği çalışmalarında DHAP kullanılarak gerçekleştirilen deneyler sonucunda $1/V$ değerlerine karşı $(1/S)$ değerlerinin grafikleri çizildi (Şekil 4.3.2.3-4a).

DHAP'ın yapılan kinetik incelemeler ile , sağlıklı insan plasental aldolazının non-kompetitif inhibitörü olduğu bulundu. DHAP'ın K_i değeri, $1,039 \pm 0,107$ mM olarak hesaplandı.

Non-kompetitif inhibisyonda inhibitörün substrat bağlama bölgesine doğrudan bir etkisi yoktur. Substrat ve inhibitör, geri dönüşümlü, rastgele ve birbirlerinden bağımsız olarak farklı bölgelere bağlanırlar. İnhibitör hem serbest enzime hem de ES kompleksi oluşturmuş olan enzime bağlanma özelliğine sahiptir.

İnhibitör etkisini, bir konformasyonel değişim oluşturarak gösterir. Meydana gelen ESI kompleksi inaktiftir ve ürün oluşturamaz (48).

Gestasyonel diyabetik insan plasental aldolazı üzerinde DHAP'ın kompetitif inhibisyon etkisi olduğu bulundu. DHAP'ın Ki değeri, $0,766 \pm 0,035$ mM olarak hesaplandı.

Kompetitif inhibisyonda inhibitör, substrat ile aynı bölgeye bağlanır ve substratıyla yarışır (48). Çeşitli DHAP analoglarıyla yapılan bir çalışmada, tavşan kas aldolazı'nın kompetitif inhibitörü olduğu bildirilmiştir (58).

Fruktoz 1,6 BP'ın 1-Fosfat bağlama bölgesi Arjinin 148 ve Lizin 146 olduğu, 6-Fosfat bağlama bölgesinin Lizin 41 ve Arjinin 42 ile oluşturulduğu, C terminal Tirozin, Lizin ile Schiff bazı oluşturduğu bilinmektedir (1-3, 19, 21). Aldolazın substratı olan fruktoz 1,6 bisfosfat, üzerinde iki adet fosfat grubu içerir ve enzimin aktif merkezindeki Arg ve Lys amino asitlerine bağlanır. Aldolazın, fruktoz 1,6 bisfosfat'dan oluşumunu katalizlediği DHAP ise, ürün inhibisyonunu, içerdiği fosfat grubu aracılığı ile enzimin substrat bağlanma bölgesindeki Arg ve Lys'lere bağlanarak gerçekleştirir.

Çalışmada, DHAP'nin GDM insan plasental aldolazında kompetitif inhibisyon yaptığı (Şekil 4.3.2.4a) ancak bundan farklı olarak, sağlıklı insan plasental aldolazı üzerine etkisinin non-kompetitif özellikte olduğu saptandı (Şekil 4.3.2.3a). Bu duruma, diyabetin enzimin aktif yapısında bazı konformasyonel değişikliklere yol açarak sebep olduğu düşünülmektedir. Aldolaz enziminin, bir çok metabolik hastalıkta aktivitesinin azaldığı hatta yitirildiği göz önüne alınacak olursa (23-26), diyabetin de placentada dokusunda bazı hasarlara yol açarak enzimin aktivitesini etkilediği söylenebilir. Literatürden (58) farklı olarak DHAP'ın sağlıklı plasental aldolazıyla non-kompetitif, GDM'li plasentadan saflaştırılan enzim ile kompetitif inhibisyon yapması; enzimin değişik dokulardaki yapısal ve kinetik farklılıklarından kaynaklandığı düşünülebilir.

ATP kullanılarak yapılan inhibisyon deneyleri sonucunda elde edilen veriler Systat istatistik programının non-lineer modülü ile inhibisyon modellerine uyumu incelendi. Systat 11 nonlinear regresyon modülündeki inhibisyon modellemeleri sonucu, ATP'nin, hem sağlıklı hem de gestasyonel diyabetik insan plasental

aldolazının “partial-kompetitif” inhibitörü olduğu saptandı. Sağlıklı insan plasentası aldolazı için elde edilen kinetik parametreler $K_i=0,074\pm0,026$ mM ve $\alpha=3,287\pm0,434$ olarak bulundu. Gestasyonel diyabetik insan plasental aldolazının kinetik parametreleri ise $K_i, 0,136 \pm 0,049$ mM ve $\alpha, 4,089\pm0,539$ olarak hesaplandı.

ATP ile inhibisyon kinetiği çalışmasının ilk bölümünde, artan inhibitör derişimlerine karşı sabit substrat derişiminde ilk hızlar ölçülerek V değerlerine karşı inhibitör derişimleri grafikleildi. Buna göre, hızların sıfırlanmadığı ve limit bir değerde kaldığı görüldü. Çalışmamızda, her iki plasentadan saflaştırdığımız aldolazların, sabit substrat ve değişen inhibitör derişimlerinde hızın sıfırlanmadığı bulundu. Buna göre, ATP inhibisyonunun, her iki enzim için de “partial kompetitif” olduğu gözleildi (Şekil 4.3.2.3b1).

“Pure-kompetitif” inhibisyonda artan inhibitör derişimlerinde ve sabit substrat derişiminde, ilk hızlar ölçülerek V değerlerine karşı inhibitör derişimleri grafikleildiğinde, hız sıfıra ulaşır. Ancak, “partial kompetitif” inhibisyonda hızın sıfırlanmadığı, limit bir değere ulaşıldığı bilinmektedir (48).

Her iki enzime ait inhibisyon çalışmalarının Dixon grafiklemeleri Şekil 4.3.2.3b ve Şekil 4.3.2.4b’de gösterilmiştir. Burada da görüldüğü gibi, inhibitör derişimlerine karşı $1/V$ doğruları çizildiğinde, inhibitör çizgilerinin doğruluktan saparak kıvrılma gösterdiği saptanmıştır.

Dixon grafiklemesi alternatif bir kinetik veri sunumudur. Dixon grafiklemesinde; inhibitör derişimlerine karşı $1/V$ doğruları çizilir. “Partial kompetitif” ve “mixed tip” inhibisyonlarda bu inhibitör çizgileri doğruluktan saparak kıvrılma gösterirler. Karışık tip inhibisyonlarda alfa katsayısı ve beta katsayısı vardır. “Partial kompetitif” inhibisyon’da, $1 < \alpha < \infty$ ve $\beta=1$ (yani etkisiz) ise, inhibisyon “partial kompetitif”tir. Partial-kompetitif inhibisyonda inhibitör, saf kompetitif inhibisyondan farklı olarak hem serbest enzime hem de ES kompleksi oluşturmuş enzim formuna bağlanır. Substrat ve inhibitör enzimin farklı bölgelerine bağlanarak ES, EI ve ESI komplekslerini oluştururlar. İnhibitör, substratıyla kısmi olarak yarışır (48).

ATP inhibisyonunun, içerdiği fosfat grupları aracılığı ile enzimin katalitik bölgesindeki Arg ve Lys’lere bağlanarak “partial”-kompetitif tipte gerçekleştiği düşünülmektedir. ATP’nin her iki enzim için de gösterdiği düşük K_i değerleri,

inhibisyonun oldukça güçlü olduğunu göstermektedir. Literatürde de, ATP'nin aldolaz türleri için oldukça güçlü bir inhibitör etkisi olduğu belirtilmektedir (54).

Glikolizde yer alan aldolaz enzimi nihai olarak ATP üretimini hedefleyen bir metabolik yolun bileşenidir. Hücre koşullarında yüksek derişimde ATP varlığı bu yolun daha düşük bir verimle çalışmasını sağlayacaktır. Aldolaz enziminin de, FBP gibi ATP tarafından “negative feed-back” yolu ile kontrol ediliyor olabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda, diğer bir Aldolaz ailesinin aktif merkez yapısında iki değerlikli iyonlar bulunduğu göz önüne alınarak insan plasentası aldolazı ile Mg^{+2} kinetikleri incelendi.

Yapılan çalışmalar, Mg^{+2} 'un sağlıklı plasental enzimin kompetitif inhibitörü olduğunu gösterdi (Şekil 4.3.2.3c). Ki değeri $14,678 \pm 2,702$ mM olarak hesaplandı.

Mg^{+2} 'un Systat non lineer regresyon modülünün inhibisyon modellemesi ile GDM plasental enziminin partial-kompetitif inhibitörü olduğu bulundu (Şekil 4.3.2.4c). Ki $0,218 \pm 0,113$ mM ve α katsayısı ise $1,676 \pm 0,118$ olarak hesaplandı.

Sağlıklı ve gestasyonel diyabetik aldolazların Ki değerleri karşılaştırıldığında, Mg^{+2} 'un, inhibisyon etkisinin GDM plasental aldolaz üzerinde daha güçlü olduğu (Ki, $0,218 \pm 0,113$ mM) görüldü. Bu durumun diyabetin enzim üzerinde yaptığı bir deformasyona bağlı gelişen bir komplikasyon olabileceği düşünülmektedir. Diyabetik plasentaların, bu iki değerlikli iyonun yarattığı inhibisyona olan hassasiyeti, hastalıkla bağlantılı olarak, enzimin koşullardan etkilendiğini gösterdiği öngörülmektedir.

Tüm inhibitörler karşılaştırıldığında, sağlıklı plasental aldolaz için ATP'nin güçlü bir inhibitör olduğu anlaşılmaktadır. Sağlıklı plasentadan saflaştırılan enzimin, diğerine oranla çok daha düşük bir Mg^{+2} inhibisyonundan etkilendiği görülmektedir. Bu durum, enzimin yapı ve biyokimyasında herhangi bir deformasyona uğramadığını düşündürmektedir.

Tüm inhibitörler karşılaştırıldığında, gestasyonel diyabetik plasental aldolaz için de ATP'nin güçlü bir inhibitör olduğu görülmektedir. GDM plasental aldolazın, sağlıklı plasentadan saflaştırılana oranla tüm inhibitörlere karşı daha fazla afiniteye sahip olduğu, Ki değerleri karşılaştırıldığında anlaşılmaktadır.

Her iki enzim formunun farklı kinetik davranışlar göstermesi, GDM sırasında aldolazın konformasyonel bir farklılığa uğradığını düşündürmektedir. Her ne kadar yapılan elektroforetik incelemelerde bir fark görülmese bile enzimin aktif merkez bölgesinde oluşabilecek birkaç amino asitlik fark, metillenme, glikozillenme gibi modifikasyonlar aktiviteyi etkileyecektir. Dolayısı ile GDM'nin genel etkisi enzim üzerinde bu yönde olabilir.

İnsandaki üç aldolaz izoziminin katalitik aktiviteleri ve farklı amino asit dizileriyle ayrıldığı bilinmektedir (1, 2, 9, 46). Son yıllarda, yalnızca katalitik özellikleriyle değil, elektroforetik, kromatografik ve immünolojik özellikleriyle de farklılıklar gösterdikleri bildirilmektedir (1, 4, 50). Bu çalışmada, insan plasental aldolazının katalitik özellikleri karşılaştırmalı olarak çalışıldı. Gözlenen farklı kinetik özelliklerin dokuya has özellikler olduğu kanısına varıldı. Gestasyonel diyabetli insandan saflaştırılan plasental aldolazın sağlıklı insandakine oranla gösterdiği farklılıkların diyabetin dokuda moleküler düzeyde oluşturduğu hasarlardan kaynaklandığını düşündürmektedir.

Çalışılan inhibitörlerin (DHAP, ATP, Mg^{2+}) etkileri karşılaştırıldığında ATP dışında diğer inhibitörlerin her iki enzim ile farklı tipte inhibisyon göstermesi enzimde bir konformasyonel değişim olduğunun kanıtı olarak düşünülebilir. ATP, glikoliz yolunun en önemli düzenleyicilerinden biridir. ATP'nin K_i değerinin son derece düşük olması aldolazın glikolitik yolda kontrol altında tutulan enzimlerden biri olduğunu düşündürmektedir. Bu güne dek aldolazın glikolitik yolda kontrol basamaklarından biri olduğuna dair bir kanı yoktur ancak elde ettiğimiz veriler aldolazın bu açıdan değerlendirilmesinin önemli olacağını göstermektedir. Sağlıklı aldolaza ait ATP K_i değerinin GDM'li aldolaza ait ATP K_i değerinden küçük olması, bu enzimin allosterik kontrol altında olduğunu desteklemektedir.

Son yıllarda yapılan bazı çalışmalar "substrate channeling" adı verilen bir olgu üzerine odaklanmaktadır. Bu hipoteze göre, metabolik bir yolda bulunan enzimler moleküllerin difüzyon hızından etkilenmemeleri için kompleksler oluştururlar. Bu sayede metabolik yolun bir üst basamağında oluşan ürün hız kaybedilmeden diğer enzime aktarılır. Hücre içindeki en önemli metabolik yollardan biri olan glikolizde, gliseraldehit 3 fosfat dehidrogenaz (GAPDH) ve aldolaz, aldolaz

ve fosfofruktokinaz (FBPaz) arasında böyle bir etkileşim olduğu öne sürülmektedir (56, 57). Bu varsayıma göre, FBPaz ve aldolaz aktin filamentleri üzerinde tutunurlar ve bu tutunmanın kasta fosfofruktokinazın AMP'ye olan duyarlılığını azaltmaktadır. Ayrıca inaktif FBPaz'ın aldolaz ile kompleks yapamadığı öne sürülmektedir. Mg^{2+} derişimininde kompleks oluşumu ve oluşan kompleksin dayanıklılığı üzerinde çifte etkisi olduğu rapor edilmektedir. Buna göre fizyolojik derişimlerde (1-2 mM) Mg^{2+} bu iki enzimin kompleks oluşturmasını sağlarken, daha yüksek derişimlerde kompleks yapıyı bozar (56).

GAPDH ve Aldolaz ile yapılan Brownian hareketi simülasyonları sonucu bu iki enzimin alt üniteleri arasında güçlü elektrostatik etkileşimler ve tuz köprüleri aracılığı ile intermoleküler temas gösterilmiştir. Bu varsayıma göre, GAPDH ve aldolaz birbirinin içine geçmiş bir yapı oluşturabilmektedirler (57).

Diyabette oluşan olası bir konformasyonel değişikliğin, hücre içerisinde bulunan bu Aldolaz/FBPaz ve Aldolaz/GAPDH komplekslerinin oluşumunu etkileyeceği düşünülebilir. Biz çalışmamızda fizyolojik derişimlerde Mg^{2+} ile inceleme yaptık. Mg^{2+} ile gözlenen kinetik davranış GDM ve sağlıklı Aldolaz enzimleri arasında farklılık göstermektedir ki bu da diyabetteki olası konformasyonel değişimi desteklemektedir.

Diyabette genel olarak glukoz metabolizmasında gözlenen bozukluk belki de bu sıralı enzim komplekslerinin düzgün oluşamamasından da köken alıyor olabilir. İleri çalışmalarda hem aldolaz enziminin ileri karakterizasyonu hem de diyabetin glikolitik enzimler üzerine etkilerini daha iyi gözlemek amacı ile hücre içine benzer koşullar yaratılabilir. Ayrıca GAPDH/Aldolaz etkileşimi de uygun koşullar yaratılarak gözlenebilir. Bu etkileşimlerin varlığının saptanması ile Aldolaz için son nokta tayini üzerinden değil sürekli takibini sağlayan bir enzimatik aktivite yöntemi geliştirmek de mümkün olabilir.

SONUÇLAR

1. FBPA, sağlıklı insan plasentasından 40,5 ve diyabetli insan plasentasından 63 kez saflaştırma oranı ile elde edildi.
2. Her iki enzimin optimum pH'sı 7,4 olarak saptandı.
3. Sağlıklı ve diyabetik insan plasental aldolazının optimum sıcaklığı 37 °C olarak bulundu.
4. Sağlıklı insan plasental FBPA'nın V_m 'i 1769,513±200,322 ve K_m 'i 20,003±4,497 mM olarak bulunurken, Gestasyonel diyabetik insan plasental FBPA'nın V_m 'i 939,548±60,869 ve K_m 'i 24,304±2,94 olarak hesaplandı.
5. Her iki enzimde, DHAP, ATP ve Mg^{+2} inhibisyon etkileri çalışıldı. Buna göre; DHAP; sağlıklı insandan saflaştırılan plasental aldolazın non-kompetitif inhibitörü (K_i , 1,039±0,107 mM), gestasyonel diyabetik insan plasental aldolazının ise kompetitif inhibitörü (K_i , 0,766 ± 0,035 mM) olduğu bulundu. ATP; gestasyonel diyabetik insan plasental aldolazının partial-kompetitif inhibitörü (K_i , 0,136±0,049 mM ve α 4,089±0,539) ve sağlıklı insan plasental aldolazının partial-kompetitif inhibitörü (K_i , 0,074±0,026 mM ve α katsayısı 3,287±0,434) olduğu saptandı. Mg^{+2} , sağlıklı plasental enzimin kompetitif inhibitörü (K_i , 14,678±2,702 mM) olduğu ve GDM plasental enzimi üzerinde partial-kompetitif inhibisyon yaptığı bulundu ($K_i=0,218±0,113$ mM ve $\alpha=1,676±0,118$ olarak hesaplandı).

KAYNAKLAR

1. Gamblin S. J., Davies G. J., Jackson R. M., Littlechild J. A. ve Watson H. C. (1991) Activity and specificity of human aldolases. *J. Mol. Biol.* 219:573-576.
2. Littlechild J. A., ve Watson H. C. (1993) A data-based reaction mechanism for type I fructose bisphosphate aldolase. *TIBS.* 18:36-39.
3. Voet D. ve Voet J. G. (1995) *Biochemistry*; Chapter 16, pp: 450-53.
4. Marsh J. J., ve Lebherz H. G. (1992) Fructose bisphosphate aldolases: an evolutionary history. *TIBS.* 17:110-13.
5. Sygusch J. ve Beaudry D. (1997) Subunit interaction in mamalian aldolases. *Biochem. J.* 323:671-76.
6. Sygusch J., ve Beaudry D. (1984) Catalytic activity of rabbit skeletal muscle Aldolase in the crystalline state. *The Journal of Biological Chemistry.* 259:10222-27.
7. D. E. Saez and J. C. Slebe. (2000), Subcellular Localization of Aldolase B. *Journal of cellular Biochemistry*:62-72.
8. Kelly, P. M. ve Tolan D. R. (1986) *Plant Physiology*, 82,1076-80.
9. Freemont P.S., Dunbar B., ve Fothergillmore L. A., (1988), *Biochem J.* 249:779-88.

10. Hodgson R. J. ve Plaxton W. C. (1998) Purification and characterization of cytosolic fructose-1,6-bisphosphate aldolase from endosperm of germinated castor oil seeds. *Archiv. Biochem. Biophys.* 355:189-196.
11. Izard T. ve Sygusch J. (2004). Induced Fit Movements and Metal Cofactor Selectivity of Class II Aldolases structure of thermus aquaticus FBP2 aldolase. *JBC.* 279:12, 11825–33.
12. Baron, C. B., Ozaki S., Coburn R. F., (1995) Inositol 1,4,5 triphosphate binding to porcine tracheal smooth muscle aldolase. *JBC.*, 270:20459-65.
13. Munnich, A., et al, (1985) Dietary and hormonal regulation of aldolase B gene expression. *J. Clin. Invest.* 75.1045-52.
14. Lemaigre, P. ve Rousseau, G.G., (1994) Transcriptional control of genes that regulate glycolysis and gluconeogenesis in adult liver. *Biochem. J.* 303:1-14.
15. Cox, T.M., (1988) Hereditary fructose intolerance. *Quart.J.Med.*, 68:585-94.
16. Gitzelman,R., et al., (1995) Disorders of fructose metabolism. In the metabolic basis of inherited disease. McGraw Hill, NY., 1:905-34.
17. Kishi, H., et al., (1987) Human aldolase A deficiency associated with a hemolytic Anemia: Thermolabile Aldolase due to a single base mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.*, 84:8623-27.
18. Beernink, P. T. ve D.R. Tolan, (1994) Subunit interface mutants of rabbit muscle aldolase form active dimers. *Prot. Science*, 3:1383-91.
19. Creighton, D.J. ve N.S.R.K Murthy, (1990) Stereochemistry of enzyme-catalyzed reactions at carbon. *The Enzymes*, 19:323-421.

20. Tolan, D.R., et al., (1984) The complete nucleotide sequence for rabbit muscle aldolase A messenger RNA, JBC, 259(2):1127-31.
21. Sygusch, J.D. ve diğeri (1987) Molecular Architecture of rabbit skeletal aldolase at 2,7 Å resolution. Proc. Natl. Acad. Sci., 84:7846-50.
22. Rutter W. J. (1964) Fed. Proc., 23:1248-57.
23. Burtis C. A. ve Ashwood E. R. (1994) Tietz Text Book Of Clinical Chemistry. pp: 776, 810-12, 2107-08.
24. Cox, T.M., (1988) Hereditary fructose intolerance. Quart.J.Med., 68,585-94.
25. Gitzelman,R., et al., (1995). Disorders of fructose metabolism. In the metabolic basis of inherited disease. McGraw Hill, NY., 1:905-34.
26. Lemaigre, P. ve Rousseau, G.G., (1994). Transcriptional control of genes that regulate glycolysis and gluconeogenesis in adult liver. Biochem. J., 303:1-14.
27. Lebhertz, H. G., Ruter W.J., (1969). Distribution of fructose diphosphate aldolase variants in biological systems. Biochem., 8:109-21.
28. Neyzi O. (1989) Pediatri, Nobel Tıp Kitapevi, İstanbul. Syf: 239-43.
29. Gürgüç C. A. (1986) Doğum Bilgisi, Yargıçoğlu Yayınevi, Ankara.
30. American Diabetes Association, Inc: (1986). Gestational diabetes mellitus. Ann. Intern. Med.; 105:461.

31. Osmond D. T. D., Nolan C. J., King R. G., Brennecke S. P., Gude N. M. (2000). Effects of gestational diabetes on human placental glucose uptake, transfer, and utilisation. *Diabetologia*. 43:576-82.
32. Rellos P., J. Sygusch, (2000). Expression, purification, and mutants of human aldolase B. *JBC.*, 275:1145-51.
33. Burtis C. A. ve Ashwood E. R. (1994). *Tietz Text Book Of Clinical Chemistry*. pp: 776, 810-12, 2107-08.
34. Laemli UK (1970). Cleavage of structural proteins during thr assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-85
35. Pinto V. C., Van Dreal P. A., ve Kaplan A. (1969). Aldolase: Colorimetric and spectrophotometric determination. *Clin. Chem.* 15:339-60.
36. Lowry O. H., et al. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-75.
37. Penhoet E. E., ve Rutter W. J. (1975). Detection and isolation of mammalian fructose bisphosphate aldolase. *Methods in enzymology*. 42:240-49.
38. Thomas A. Buchanan ve Anny H. Xiang (2005). Gestational diabetes mellitus. *The Journal of Clinical Investigation*, Vol:115 N:3 485-91.
39. F.M.A. Giuffrida, A.A. Castro, A.N. Atallah and S.A. Dib(2003). Diet plus insulin compared to diet alone in the treatment of gestational diabetes mellitus: a systematic review, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 36: 1297-1300.

40. Buono P., D'armiento F. P., Terzi G., Alfieri A. and Salvatore F. (2001). Differential distribution of aldolase A and C in the human central nervous system *Journal of Neurocytology* 30, 957–65.
41. Dalby, A., Z. Dauter, and J. A. Littlechild. (1999). Crystal structure of human muscle aldolase complexed with fructose 1,6-bisphosphate: mechanistic implications. *Protein Sci.* 8:291-97
42. Lorentzen E., Siebers B., Hensel R, and. Pohl E. (2005). Mechanism of the Schiff Base Forming Fructose-1,6-bisphosphate Aldolase: Structural Analysis of Reaction. *Biochemistry*, 44, 4222-29.
43. Cox, T.M., (1994) Aldolase B and fructose intolerance. *The FASEB J.* Vol:8, 62-71.
44. Nakahara K., Yamamoto H., Miyake C., and Yokota A. (2003), Purification and Characterization of Class-I and Class-II Fructose-1,6bisphosphate Aldolases from the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Cell Physiol.* 44(3): 326–33
45. Morris, A.J. and D.R. Tolan, (1994). Lysine-146 of rabbit muscle aldolase is essential for cleavage and condensation of the C3-C4 bond of fructose 1,6-bis(phosphate). *Biochemistry*, 33:12291-97.
46. Miguel St-J., Vanasse J. L., Liotard B. and Sygusch J. (2005) High resolution reaction intermediates of rabbit muscle fructose-1,6-bisphosphate aldolase: substrate cleavage and induced fit. *JBC Papers in Press*. Published on May 3.
47. Malay A. D., Prociou S. and Tolan D. R. (2002) The temperature dependence of activity and structure for the most prevalent mutant aldolase

B associated with hereditary fructose intolerance. Archives of Biochemistry and Biophysics Volume 408, 2 , 15 December, P:295-04

48. Segel I. H., Enzyme Kinetics. (1975), New York, A Wiley-Interscience Publication.
49. Lai, C.Y., N. Nakai, and D. Chang (1974), Amino acid sequence of rabbit muscle aldolase and the structure of the active center. Science, 183:1204-06.
50. Penhoet, E. E., Rutter, W. J. (1971) Catalytic and immunochemical properties of homomeric and heteromeric combinations of aldolase subunits. J. Biol. Chem. 246, 318-23.
51. S. J. Gamblin, G. J. Davies, J. M. Grimes, R. M. Jackson, J. A. Littlechild, H. C. Watson (1991), Activity and specificity of human aldolases, J. Mol. Biol. , 219, 573.
52. Stribling D, Perham RN (1973). "Purification and characterization of two fructose diphosphate aldolases from Escherichia coli (Crookes' strain)." Biochem J. 131(4):833-41.
53. Choi H., Tolan D. R. (2004) Presteady-State Kinetic Evidence for a Ring-Opening Activity in Fructose-1,6-(bis)phosphate Aldolase, J. Am. Chem. Soc., Vol. 126: 3402-03.
54. MacDonald J. A. ve Storey K.B. (2002) Purification and characterization of fructose bisphosphate aldolase from the ground squirrel, Arch. Biochem. and Biophysics 408 279–85.
55. Zhang Z. Y., Wong Y. N., (2005), Current Drug Metabolism, Vol:6 No:3:241-57.

56. Rakus D., Pasek M., Dzugaj A., (2004) *Biochemistry*, 30;43(47):14948-57.
57. Ouporov V., Knull R., Huber A, Thomasson K. A., (2001), *Biophysical Journal* Vol:80 June 2527–35.
58. Gefflaut T., Blonski C, Perie J. (1996), *Bioorg Med Chem.* Dec;4(12):2043-54.
59. Grazi, E., Trombetta, G. (1978) *Biochem. J.* 175, 361.
60. Iyengar R., Rose I. A. (1981) *Biochemistry* Mar 3;20(5):1223-9.