

283867

T. C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İNSAN SERUM PSÖDOKOLİNESTERAZININ
KİNETİK ÖZELLİKLERİ**

BİYOKİMYA PROGRAMI
DOKTORA TEZİ

SELAHATTİN ÖZEN

ANKARA — 1989

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İNSAN SERUM PSÖDOKOLİNESTERAZİNİN
KİNETİK ÖZELLİKLERİ

BİYOKİMYA PROGRAMI
D O K T O R A T E Z İ

SELAHATTİN ÖZEN

DANISMAN ÖĞRETİM ÜYESİ
PROF. DR. E. FERHAN TEZCAN

ANKARA - 1989

İÇİNDEKİLER

SAYFA NO.

GİRİŞ	I
GEREÇ VE YÖNTEMLER	8
- GEREÇLER	8
- YÖNTEMLER	8
- PKE AKTİVİTESİ TAYİNİ	8
- PROTEİN TAYİNİ	II
BULGULAR	12
- PKE'NİN KİNETİK SABİTLERİNİN VE KİNETİK DAVRANIŞININ SAPTANMASI	12
- PKE'DEKİ PROTOTROPİK GRUPLARIN PH VE TEMPERATÜR ÇALIŞMALARI İLE SAPTANMASI	16
- PKE'NİN AKTİVASYON ENERJİSİNİN SAPTANMASI	26
- İNHİBİSYON DENEYLERİ	28
- MEPIVAKAİN İNHİBİSYONU	29
- SİTANEST İNHİBİSYONU	36
TARTIŞMA	41
ÖZET	50
KAYNAKLAR	51
EK BİLGİLER	57

G İ R İ Ş

Psödokolinesteraz (PKE) (asilkolin asilhidrolaz EC 3.1.1.8) başlıca serum, karaciğer, ince barsak ve kalpte bulunur. Serum proteinlerinin % 0.1'ini oluşturur.

Enzim aşağıda verilen tepkimeyi katalize eder (1) :



Moleküldeki R' genel olarak kolin kalıntısıdır; R , asetil, propionil, bütiril ya da benzoil olabilir.

Enzimin, kolin içeren sübstratlara afinitesi daha fazla olmakla beraber, diğer esterlerin hidrolizini de katalize ettiği bilinmektedir.

PKE'nin fizyolojik görevi tam olarak anlaşılamamıştır. Bununla beraber, özellikle 1950'lerden bu yana, ameliyatlarda kas gevşeticisi olarak kullanılan suksinilkolin (2) ve lokal anestezide kullanılan prokain ve türevlerinin metabolizmasında önemli rol oynadığı bilinmektedir (3,4).

Enzimin genetik kontrolü iki lokusta yer alan allelik genler tarafından yapılır (5). E_1 lokusu için, E_1^u , E_1^a , E_1^f , E_1^s , E_1^t , E_1^r , E_1^j , E_1^k genleri; E_2 lokusu için ise, E_2^- ve E_2^+ genleri tariflenmiştir.

E_1^u normal (usual), E_1^a atipik PKE genlerini gösterir ve $E_1^u E_1^u$ genotipinin sıklığının % 96-98 kadar olduğu rapor edilmiştir.

E_1^s ve E_1^t genleri ise sessiz (silent) genlerdir ve homozigot olarak sessiz genlere sahip varyantlarda serum PKE aktivitesinin, kullanılan substrata bağlı olarak son derece düşük ya da tamamen eksik olduğu saptanmıştır (5,6).

E_2^- geni, E_2 lokusu için normal geni oluşturmaktadır.

Enzimin eksikliğinde ya da atipik PKE genine sahip bireylerde, ameliyatlarda verilen süksinilkolinin hidrolize edilememesine bağlı olarak uzayan paralizi ve ölümlü sonuçlanabilen apne görülebilir. Bu nedenle PKE varyantlarını ve izozimlerini kolaylıkla saptayabilecek yöntemler geliştirilmiştir (7-10).

Son yıllarda, serumda hiper-kolinesteraz aktivitesine sahip bir varyanttan elde edilen PKE izoziminin de bazı özellikleri saptanarak, rapor edilmiştir (11).

Klinikte PKE serum seviyesi, organofosfat içeren insektisit zehirlenmelerinde bir belirteç olarak kullanılmakta (12); mide, böbrek ve akciğer kanserlerinin teşhisinde de yardımcı olabileceği ileri sürülmektedir (1).

Enzim ilk olarak insan plazmasından Surgenor (13) tarafından alkol çöktürmesi ve amonyum sulfat kesitlemesi ile 3500 kez saflaştırıldı.

Bölümümüzde yapılan çalışmalarla da PKE, insan plazmasından 10 000 kez saflaştırılarak kristallendirildi (14).

Son yıllarda enzimin saflaştırılmasında afinite kromatografisi yöntemi kullanılmaktadır (15,16).

Çeşitli gruplar tarafından yürütölen molekül ağırılığı ve alt birim

çalışmaları farklı sonuçlar vermiştir.

Boutin ve Brodeur (17) PKE'nin, molekül ağırlığı 86 000 olan alt birimlerin agregasyonu ile oluştuğunu, serumdaki agregatların büyük kısmının ise tetramerik bir yapı gösterdiğini ileri sürdüler.

Muensch ve arkadaşları (18) ise insan serum PKE'sinin molekül ağırlığının yaklaşık olarak 340 000 olduğunu buldular.

Sedimentasyon ve diffüzyon çalışmalarına dayanan bir yöntemle Tezcan (19), enzimin molekül ağırlığını 310 000 olarak hesapladı. Bir başka çalışmada da, aynı araştırmacı tarafından, Sephadex G-200 jel elemesi yöntemiyle, PKE'nin molekül ağırlığı $300\ 000 \pm 16\ 000$ olarak saptandı ve % 1 sodyum dodesil sülfat içeren ortamda inkübe edilerek, % 10'luk poliakrilamid jel elektroforezine uygulandığında $150\ 000 \pm 12\ 000$ molekül ağırlığında alt birimlere ayrıldığı gösterildi (20).

Lockridge ve arkadaşları (21) enzimin 340 000 molekül ağırlığında tetramerik bir yapıya sahip olduğunu; enzimin, % 1 sodyum dodesil sülfatla inkübasyonundan sonra 180 000 molekül ağırlığındaki alt birimlere, % 1 sodyum dodesil sülfat ve 40 mM ditiyotreitol ile inkübasyondan sonra ise, 90 000 molekül ağırlığındaki alt birimlere ayrıştığını gösterdiler.

Aynı araştırmacı grubu (22), insan serum PKE'sini pepsin ile hidrolitik olarak parçaladıktan sonra, peptitleri yüksek basınçlı sıvı kromatografisi tekniği ile saflaştırdılar ve amino asit dizilerini saptadılar. Çalışmanın sonunda, 574 amino asitten oluşan herbir altbirimin, Cys 65 - Cys 92, Cys 252 - Cys 263 ve Cys 400 - Cys 519 arasında olmak üzere, üç adet zincir içi disülfid köprüsüne sahip olduğunu; iki alt birimdeki Cys 571'lerin ise zincirler arası disülfid köprüsü yaptığını buldular.

Sonuç olarak, yapılan moleköl ağırlığı ve alt birim çalışmalarından PKE'nin, en az dört alt birimden oluştuğu ve bu alt birimlerin ikişer, ikişer disülfid bağı ile bağılı olduğu söylenebilir.

Aktif merkez sayısını saptamak için yapılan çalışmalarda, Muensch ve arkadaşları (18) 8000 kez saflaştırdıkları enzim örneğinde P^{32} ile işaretli diizopropilfluorofosfat içeren ortamda yapılan denge dializi çalışmaları sonunda, dört alt birim için iki diizopropilfluorofosfat bağlama bölgesi saptadılar.

Lockridge ve LaDu (23) ise, fluoresan bir bileşik : N-metil-(7-dimetilkarbamoksi) quinolonium iyodür kullanarak normal ve atipik serum PKE varyantlarından elde edilen enzim örnekleri için, dört alt birim başına dört aktif merkezin varlığını gösterdiler.

1950'lerde Wilson ve Bergmann (24), yapıca PKE'ye benzeyen asetikolinesterazın aktif merkezinin anyonik ve esteratik bölge olmak üzere iki kısımdan oluştuğunu ileri sürmüşlerdi. Daha sonraları, yapılan aktif merkez işaretlemesi çalışmaları ile, esteratik bölgede bir histidin ve serin amino asidinin varlığı saptandı. Anyonik bölgede de bir glutamik asidin bulunduğu düşünülmektedir (5).

Lockridge ve LaDu (25) normal, atipik ve sessiz PKE izozimlerinde, aktif merkezdeki serini tritium içeren diizopropilfluorofosfatla işaretleyip, tripsinle muamele ettiler ve triptik peptitleri yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile ayırarak amino asit dizisini saptadılar. Normal izozim için, 29 amino asitlik triptik peptitte amino asit dizisi aşağıdaki gibi bulunmuştur :

- Ser - Val - Thr - Leu - Phe - Gly - Glu - Ser - Ala - Gly - Ala -
Ala - Ser - Val - Ser - Leu - His - Leu - Leu - Ser - Pro - Gly - Ser -
His - Leu - Leu - Phe - Thr - Arg -

Burada -N- ucundan itibaren 8. sıradaki serin, esteratik bölgede katalizden sorumlu olan amino asittir.

Atipik genotip için 22, sessiz genotip için ise 8 amino asitlik bir dizinin normale uyduğu gösterildi.

Daha sonra, Lockridge ve arkadaşları (26) insan serum PKE'sinin tüm amino asit dizisini Edman degradesyonu ile saptadılar ve enzimin herbir alt biriminin 574 amino asit içerdiğini; enzimin % 20'sini oluşturan sialik asit gruplarının (5) bu dizide yer alan 9 asparajine bağlandığını ve aktif merkezdeki serinin N- ucundan itibaren 198. amino asidi oluşturduğunu buldular.

Beyin PKE'si ile yapılan klonlama çalışmaları da, saptanan 1722 baz çiftine sahip sıranın insan serum enzimi için bulunan 574 amino asidin sırasına uygun olduğunu gösterdi (27).

Yapılan diğer klonlama çalışmaları sonunda, insan serum PKE'sinin aktif merkezindeki amino asit dizisi ile Torpedo balığından elde edilen asetilkolinesterazın aktif merkezi arasında büyük bir benzerlik olduğu ortaya çıkartıldı (28). Elde edilen sonuç evalüsyonda, kolinesterazların bu bölgesinin korunduğunu göstermekte ve bilinmemekle beraber, serum PKE'sinin önemli bir rolü olduğunu düşündürmektedir.

PKE'nin kinetik davranışının, kullanılan substratlara bağlı olarak değiştiği gösterildi. Benzoilkolin, bütiriltiokolin gibi sübstratlarla

yapılan çalışmalarda, v ye karşılık (s) değerleri grafiklendiğinde, enzimin davranışının Michaelis-Menten kinetiğine uymadığı yüksek substrat konsantrasyonlarında substrat aktivasyonu gösterdiği saptandı (2).

Bölümümüzde yapılan çalışmalarla da, insan plazmasından saflaştırılan enzimin allosterik bir davranışa sahip olduğu gösterilerek, inhibitör ve aktivatörleri tarif edildi (29). Karboksil grupları "sis" durumunda olan polikarboksilatların enzimin en kuvvetli aktivatörleri olduğu bulundu (30).

Değişik substratlar kullanılarak, yapılan pH çalışmaları ile, PKE'nin aktif merkezindeki grupların pK_a değerleri saptanmağa çalışıldı ve pK_a 'sı 6.0-7.0 arasında değişen bir grubun, diğer bir deyişle histidin amino asidine ait imidazol grubunun aktiviteden sorumlu olduğu gösterildi (5).

Yapılan temperatür çalışmalarında, King ve Morgan (31) tarafından temperatürün serum kolinesteraz genotiplerine olan etkisi incelendi ve substrat olarak benzoilkolün kullanıldığında optimum temperatürün $E_1^a E_1^a$ genotipi için 32-35°C, $E_1^u E_1^u$ için ise 50-51°C olduğu bulundu.

Yapılan diğer araştırmalarda da substrat olarak o-nitrofenilbütirat kullanılarak Arrhenius grafiği çizildiğinde, ısıyla indüklenen konformasyon değişmesine bağlı olarak 21°C'da, doğrudan bir kırılma olduğu saptandı ve ayrıca basıncın enzimin kinetik davranışı üzerine olan etkisi incelendi (32,33). Buna karşılık sıçan beyni kapillerinden elde edilen PKE için Arrhenius grafiğinin monofazik olduğu saptandı (34).

Bununla beraber, klinik biyokimya alanında ya da moleküler düzeyde yapılan tüm araştırmalara rağmen, insan serum PKE'sinin gerçek fizyolojik görevi bilinmemektedir.

A M A Ç :

Sunulan tezdeki çalışmalar üç kısım altında toplanabilir :

- a) PKE'nin kinetik sabitlerinin ve kinetik davranışının saptanması.
- b) PKE'deki prototropik grupların pH ve temperatur çalışmaları ile saptanması.
- c) PKE'nin lokal anestezide kullanılan mepivakain ve sitanest tarafından inhibisyonu ve inhibisyon tipinin saptanması.

Araştırmanın amacı, elde edilen bulgulardan PKE'nin tepkime mekanizmasına açıklık getirmeye çalışmaktır.

G E R E Ç V E Y Ö N T E M L E R

G e r e ç l e r :

Çalışmada kullanılan bileşikler kimyasal olarak saftır.

Protein standardı olarak kullanılan sığır serum albumini, Armour Pharmaceutical Firması'ndan; N-(2-metilfenil)-2-(propilamino)-propanamid (Sitanest), Astra Chemicals Firması'ndan; insan plazma kolinesterazı (PKE), bütiriltiyokolin (BTK) ve 5,5'-ditiyo-bis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB), Boehringer Firması'ndan; fosfat tamponlarının (KPO_4) hazırlanmasında kullanılan asit ve tuzlar, British Drug Houses Firması'ndan; 3-(N-morfolino) propansülfonik asit (MOPS), Sigma Firması'ndan ve N-(2,6-dimetilfenil)-1-metil-2-piperidin karboksamid hidroklorür (mepivakain), Woelm Pharma Firması'ndan sağlanmıştır.

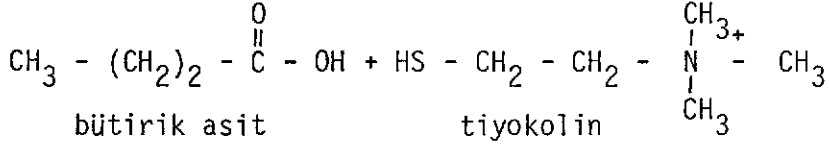
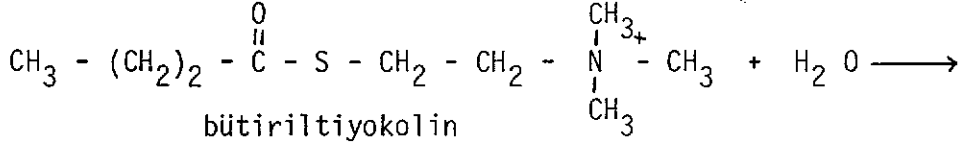
Çalışmada sunulan kinetik deneylerin tümü Vitatron SPS spektrofotometresinde yapılmıştır.

Y ö n t e m l e r :

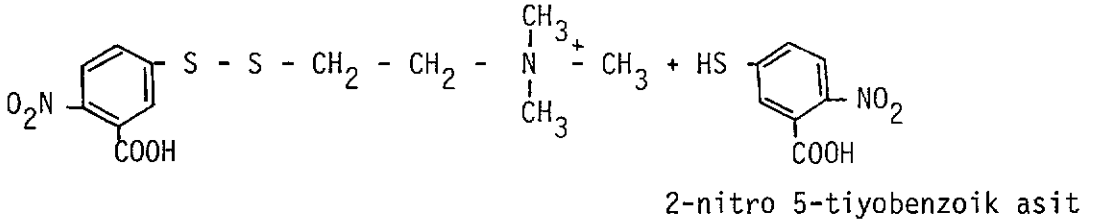
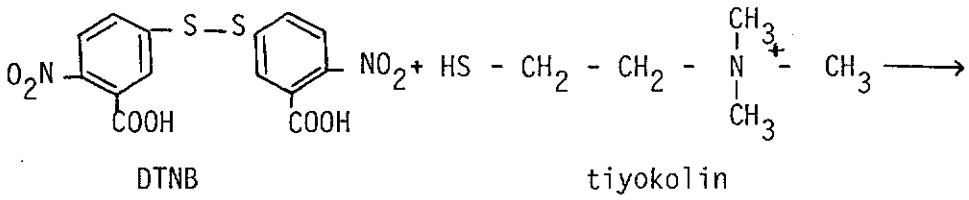
PKE Aktivitesi Tayini : Ellman ve arkadaşları (35) tarafından önerilen yöntem değiştirilerek uygulandı. Yöntem, sübstrat olarak kullanılan bir tiyokolin esterinden PKE etkisiyle açığa çıkan tiyokolin miktarının saptanmasına dayanır.

Çalışmada tiyokolin esteri olarak BTK kullanıldı.

Tepkime aşağıdaki şekilde verilebilir :



Oluşan tiyokolin DTNB ile tepkimeye girer :



Enzim aktivitesi, DTNB'nin indirgenmesiyle oluşan sarı renkli 5-tiyo 2-nitrobenzoik asit miktarınının 412 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile tayin edildi. Bu bileşik için molar "extinction coefficient" $E_{412} = 1.36 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ olarak alındı.

Ölçmeler, 10 mM tampon içinde 2.5×10^{-4} M DTNB ve genel olarak 0.1-4.0 mM arasında değişen BTK ve uygun miktarda enzim içeren deney karışımları kullanılarak yapıldı.

Kör olarak, enzim dışında diğer bileşiklerin bulunduğu bir karışım kullanıldı.

Spektrofotometrede inkübasyon süresi 60 sn'e ayarlandı ve absor-
bans değişikliği 20 sn süre ile izlendi (aletin gecikme zamanı 20 sn'dir).

İlk hızlar, mg enzim başına dakikada oluşan μmol ürün olarak hesap-
landı.

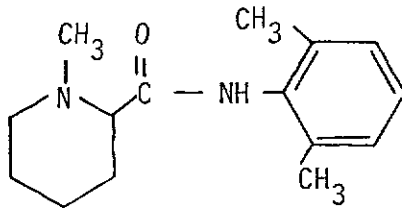
Enzimin K_S , V_m , n_H gibi kinetik sabitleri, yukarda verilen deney ka-
rışımları kullanılarak, $\text{pH} = 7.5$ ve 37°C için saptandı. Deney karışımları
10 mM KPO_4 ya da 10 mM MOPS tamponu içinde hazırlandı.

Enzimin aktivitesi üzerine pH 'nın ve temperaturün etkisini incelemek
amacıyla yapılan deneylerde ise değişik pH 'larda KPO_4 tamponları kullanılı-
dı ve aktiviteler 25°C , 30°C ve 37°C 'da ölçüldü.

Lokal anestezide kullanılan mepivakain ve sitanestin inhibisyon et-
kilerinin incelendiği deneylerde de, yukarda tariflenen ve 10 mM MOPS tam-
ponu ($\text{pH} = 7.5$) içinde hazırlanmış deney karışımları kullanıldı. Aktivite-
ler 37°C 'da ölçüldü.

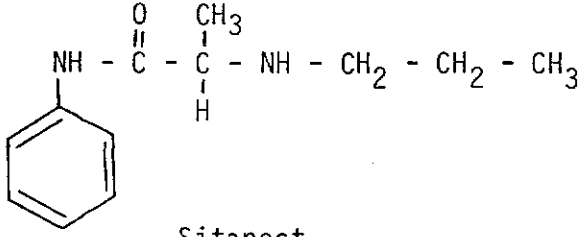
Bu deneylerde 0.15, 0.3 ve 0.6 mM mepivakain ve 0.2, 0.6, 2.0 ve
6.0 mM sitanest konsantrasyonlarında çalışıldı.

Mepivakain ve sitanestin kimyasal formülleri aşağıda verilmiştir :



Mepivakain

N-(2,6-dimetilfenil)-1-metil-2-piperidinkarboksamid



N-(2-metilfenil)-2-(propilamino)-propanamid

Protein Tayini : Örneklerde protein tayinleri, Lowry ve arkadaşları (36) tarafından önerilen yöntemle göre, standart olarak sığır serum albumini kullanılarak yapıldı.

İstatistiksel Değerlendirme : Elde edilen bulguların değerlendirilmesinde kullanılan Lineweaver-Burk grafikleri, Hill grafiği ve diğer doğrusal grafikler, regresyon eşitlikleri bulunarak çizildi (37).

B U L G U L A R

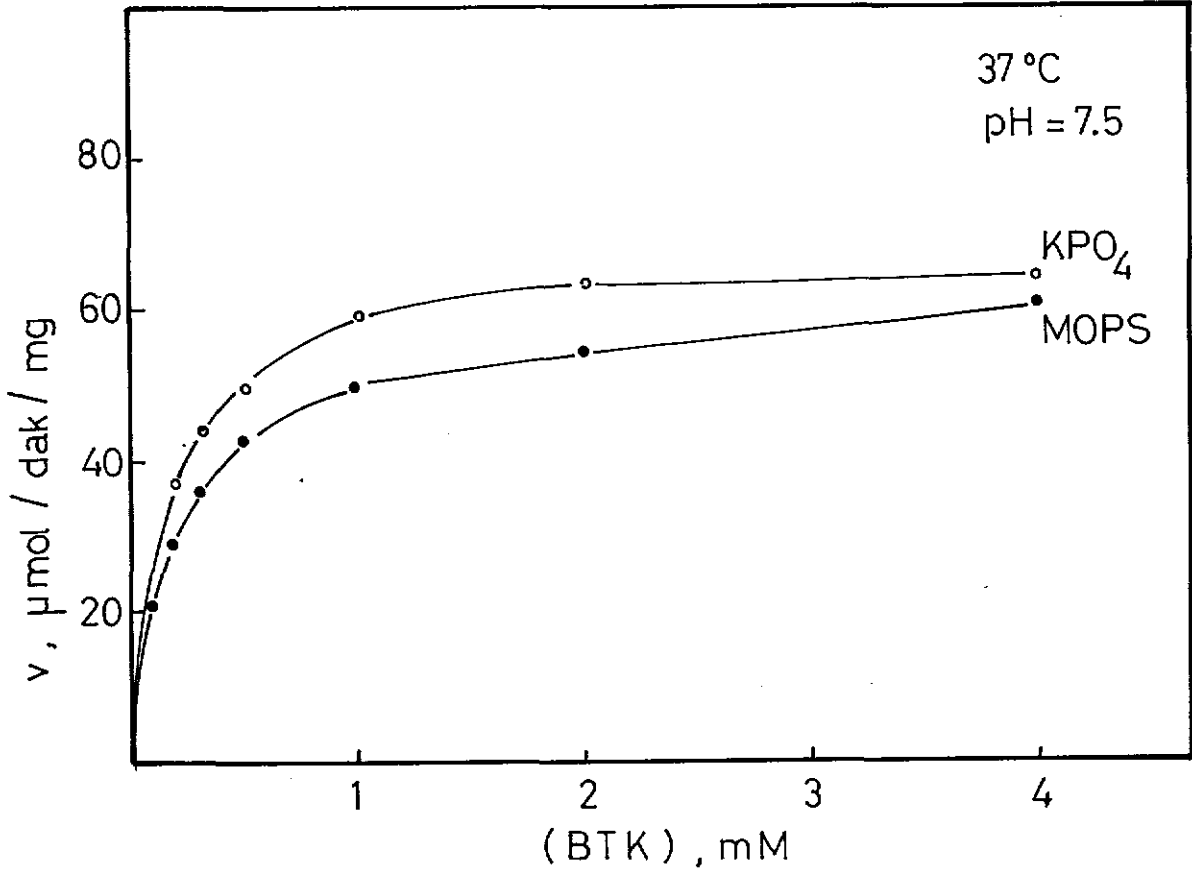
PKE'nin Kinetik Sabitlerinin ve Kinetik Davranışının Saptanması :

Aktivite ölçmelerinde 10 mM MOPS tamponu (pH= 7.5) ya da 10 mM KPO_4 tamponu (pH= 7.5) içinde, 2.5×10^{-4} M DTNB ve genel olarak 0.1-4.0 mM arası BTK ve uygun miktarda enzim içeren deney karışımları kullanıldı.

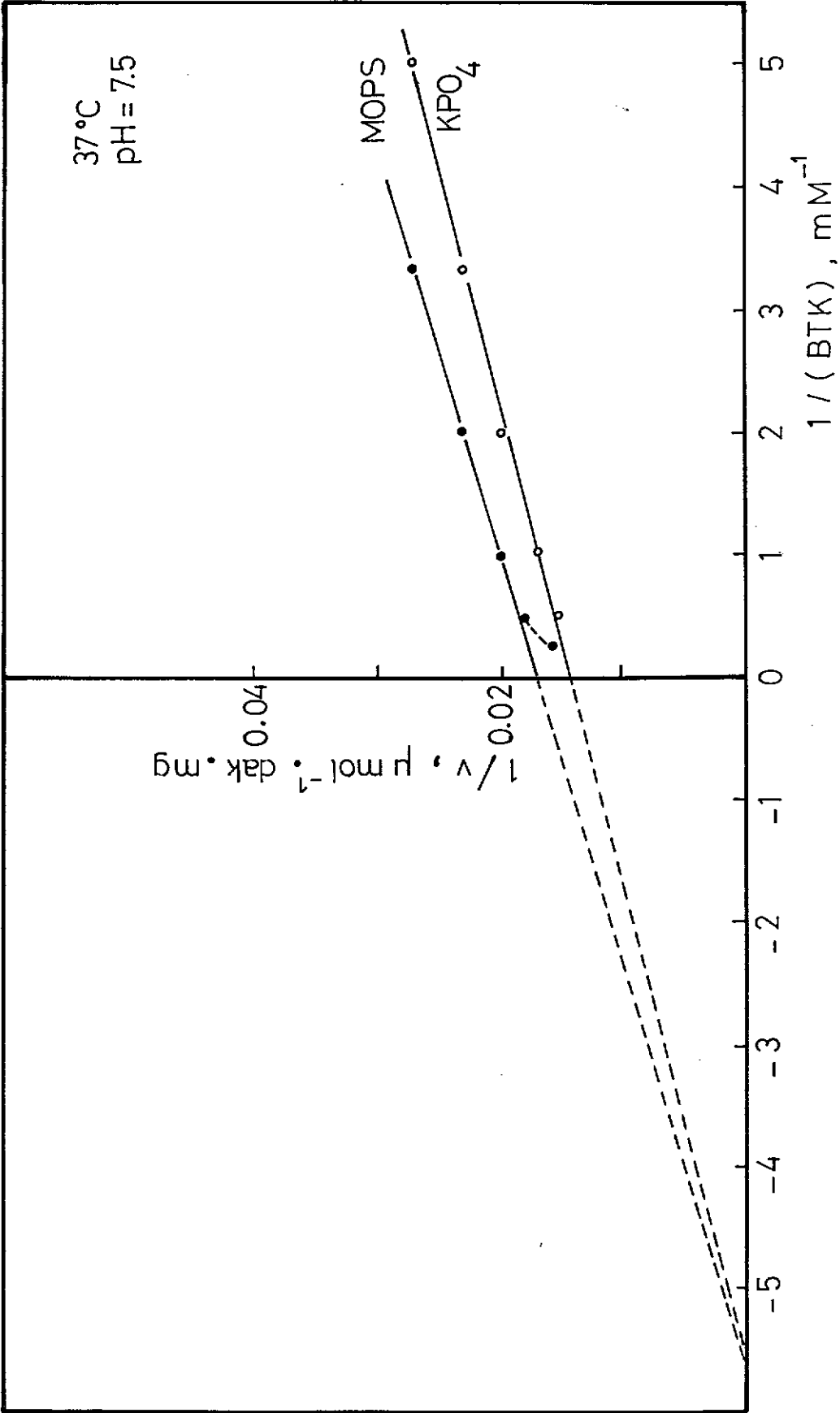
İlk hızlara, v değerlerine, karşı substrat konsantrasyonları, (S)'ler ve $1/v$ değerlerine karşı $1/(S)$ 'ler grafiklendi (Şekil-1 ve Şekil-2). Elde edilen Lineweaver-Burk doğrularının $1/v$ eksenindeki kesim noktalarından, tampon olarak KPO_4 kullanıldığında, PKE'nin görünen maksimum hızı, V_m gör. $71.4 \mu\text{mol/dak/mg}$; MOPS kullanıldığında $58.8 \mu\text{mol/dak/mg}$ olarak saptandı. $1/(S)$ eksenindeki kesim noktalarından ise KPO_4 ve MOPS içeren ortamlarda K_S gör. 0.18 mM olarak hesaplandı.

Şekil-1'deki eğrilerden $(S)_{0.75}/(S)_{0.50}$ oranları hesaplandı ve tampon olarak KPO_4 kullanıldığında bu oran 4; MOPS kullanıldığında 3.6 olarak bulundu. Elde edilen değerlerden, enzimin kinetik olarak Michaelis - Menten eşitliğine uymadığı (Michaelis-Menten eşitliğine uyan enzimlerde oran 3'tür), sübstratına karşı hafifçe negatif kooperativite gösterdiği anlaşılmaktadır (38).

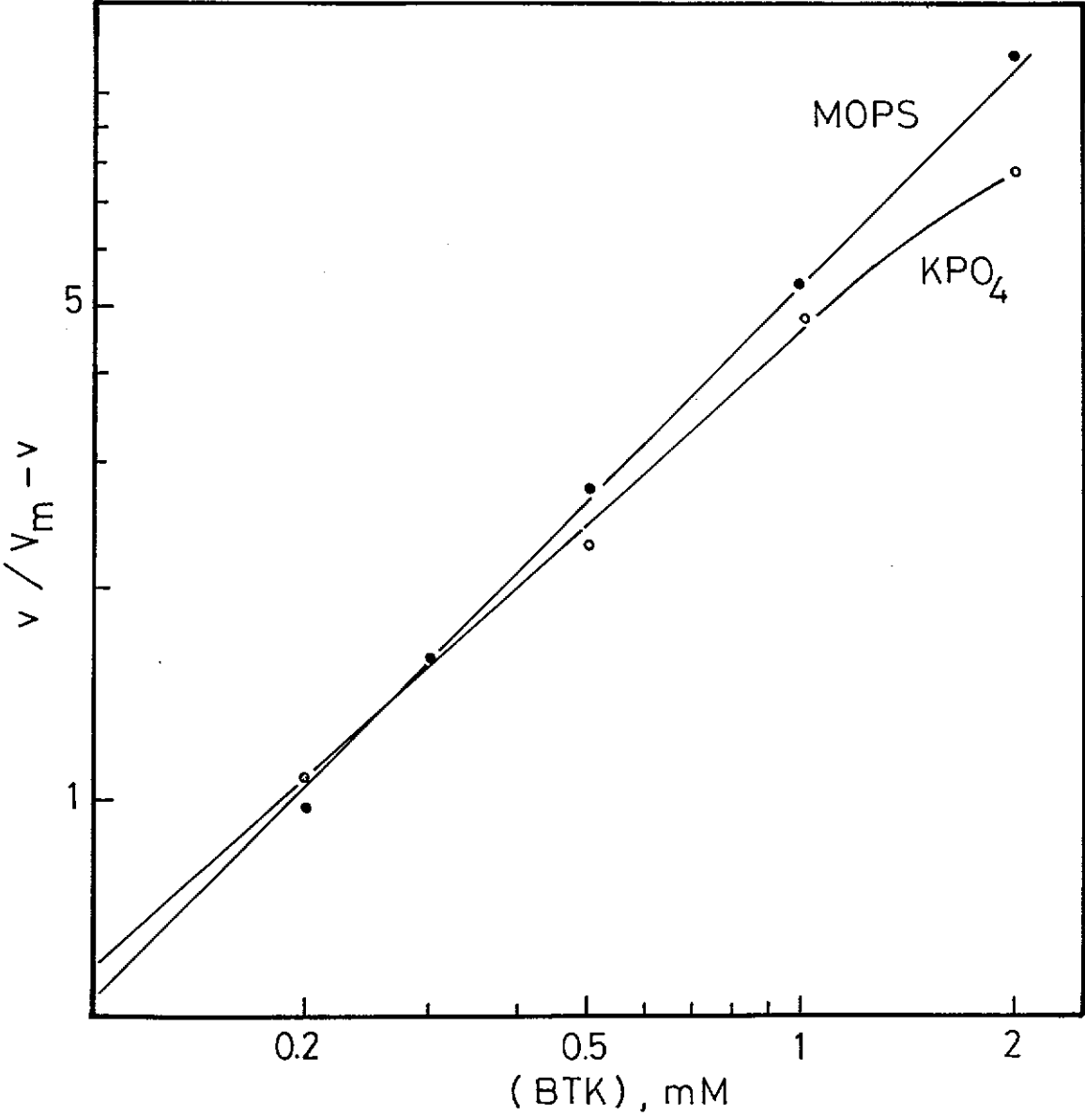
Tampon olarak KPO_4 ve MOPS kullanıldığında enzimin Hill sabitleri, n_H 'ler, sırasıyla 0.8 ve 1.1 olarak hesaplandı. Düşük ve yüksek sübstrat konsantrasyonlarında Hill doğruları lineerlikten saptıkları için, n_H değerleri $v = 0.5 \times V_m$ noktalarındaki eğimlere eşittir (Şekil-3).



Şekil-1 : 10 mM KPO₄ tamponu pH= 7.5 ve 10 mM MOPS tamponu pH= 7.5 içeren ortamlarda BTK konsantrasyonunun PKE aktivitesi üzerine etkisi.



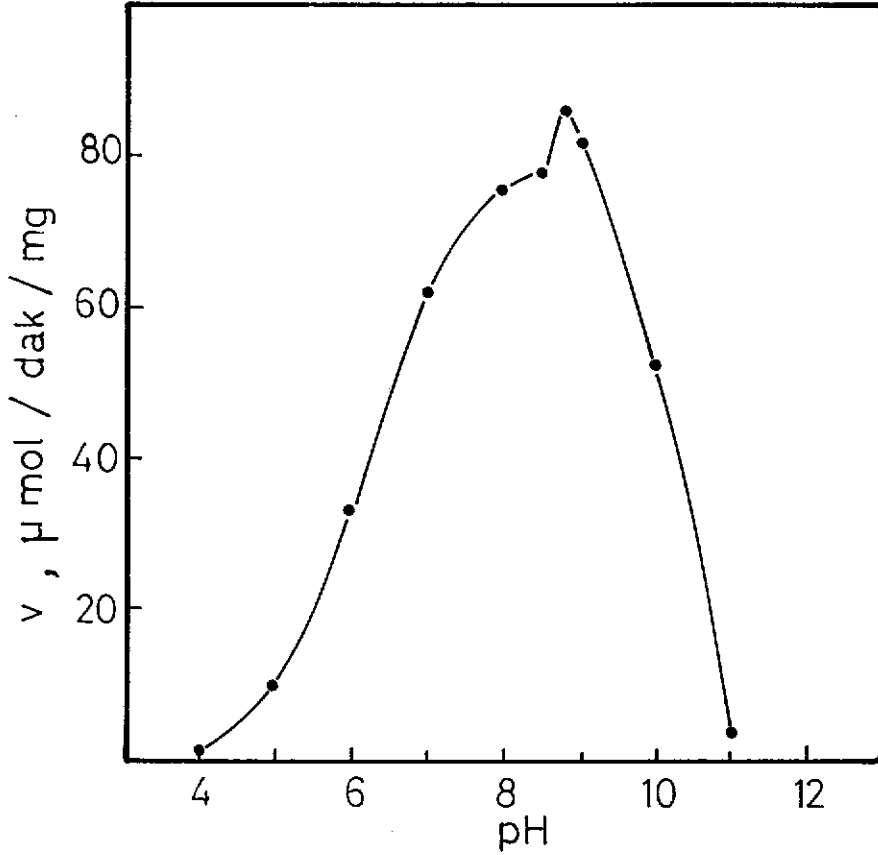
Şekil-2 : 10 mM KPO₄ tamponu pH= 7.5 ve 10 mM MOPS tamponu pH= 7.5 içeren ortamlarda PKE için elde edilen Lineweaver-Burk doğruları.



Sekil-3 : 37⁰C'da PKE için elde edilen Hill grafiği. Aktiviteler 10 mM KPO_4 tamponu pH= 7.5 ve 10 mM MOPS tamponu pH= 7.5 içeren deney karışımları kullanılarak ölçüldü.

PKE'deki Prototropik Grupların pH ve Temperatur Çalışmaları ile Saptanması (39) :

PKE'nin pH= 4.0 ile pH= 11.0 arasında aktivitesi ölçülerek, pH değerlerine karşılık hızlar grafiklendiğinde, Şekil-4'deki eğri ile karşılaşıldı. Enzimin allosterik bir enzim olması nedeniyle, moleküler etkiyi azaltmak için, bu ve daha sonra yapılan pH ve temperatur çalışmalarında, farklı tampon sistemler kullanmak yerine, pH= 2 ile pH=12 arasında tampon çözelti hazırlanmasına olanak veren bir sistem, KPO_4 tampon sistemi, kullanıldı. Bu sistemin enzim üzerine olan etkisini azaltmak için 10 mM gibi düşük bir tampon konsantrasyonu seçildi.



Şekil-4 : pH'nın PKE aktivitesi üzerine etkisi. Aktiviteler 10 mM KPO_4 tamponu içeren deney karışımları kullanılarak, 37°C 'da ölçüldü.

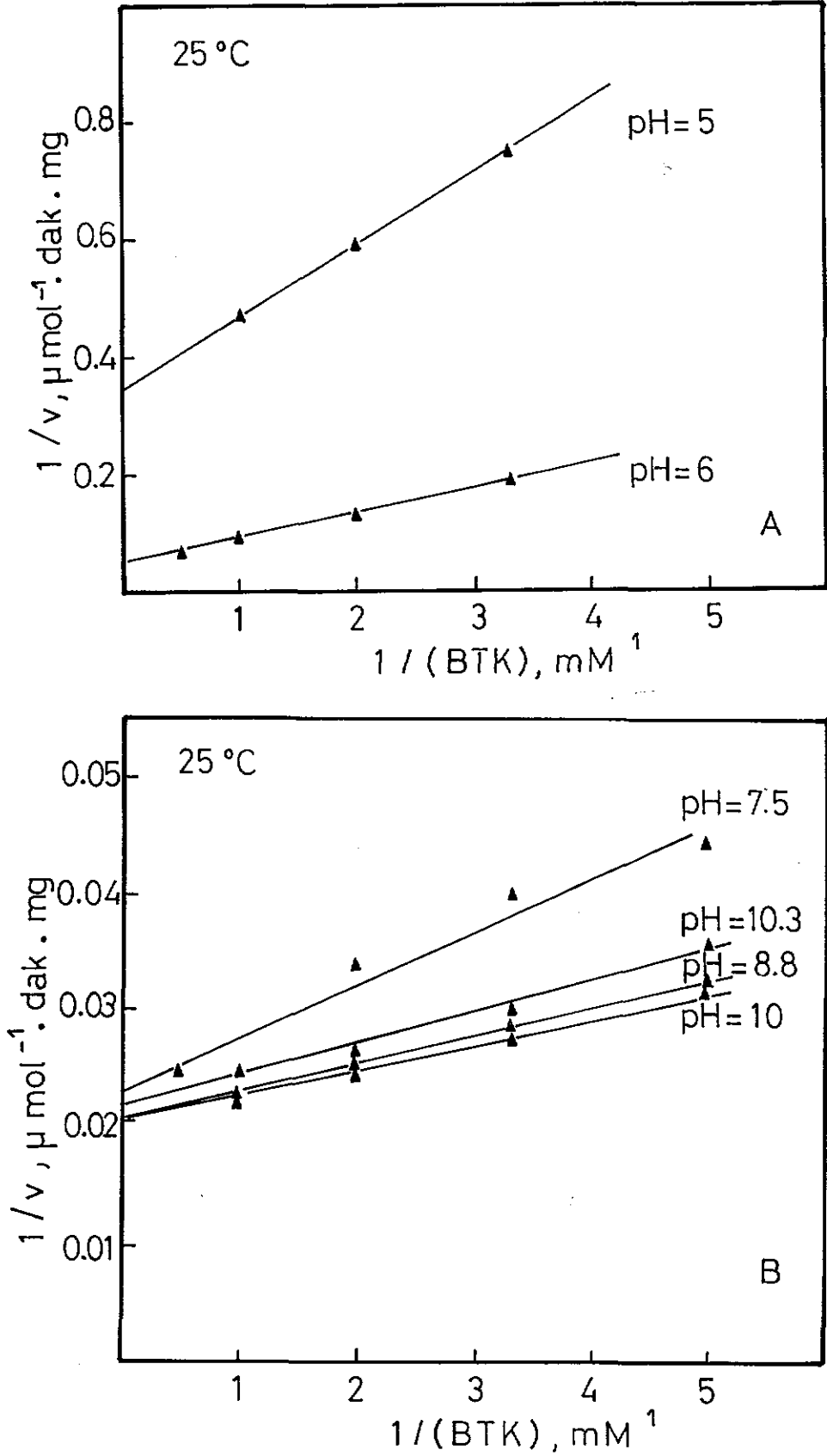
Şekil-4 PKE'nin birden fazla prototropik gruba sahip olduğunu göstermektedir. Bu nedenle değişik sıcaklıklarda, 25°C, 30°C ve 37°C'da yapılan pH deneyleri ile enzimin aktivitesinden sorumlu prototropik grupların saptanmasına çalışıldı.

PKE aktiviteleri 25°C, 30°C ve 37°C'da, pH= 5 ile pH= 10.3 arasında ölçülerek, Lineweaver-Burk doğruları çizildi (Şekil-5 A ve B, Şekil-6 A ve B, Şekil-7 A ve B), V_m gör. ve K_s gör. değerleri hesaplandı (Tablo-Ia, Tablo-Ib, Tablo-Ic).

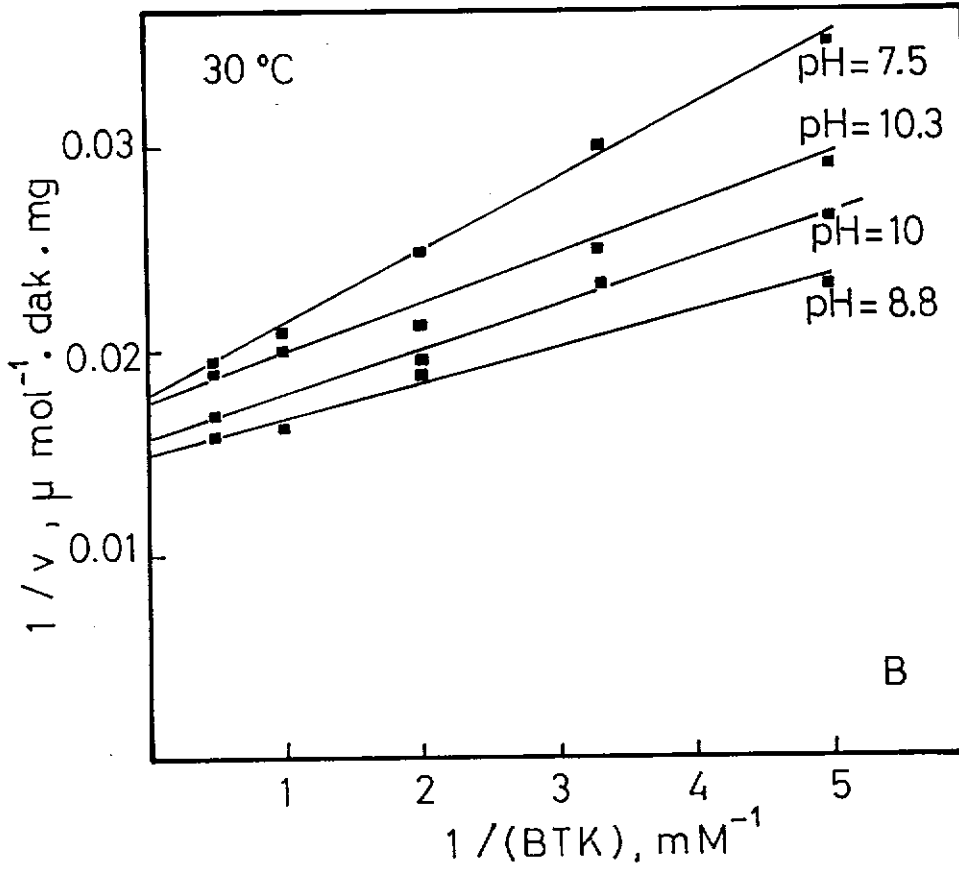
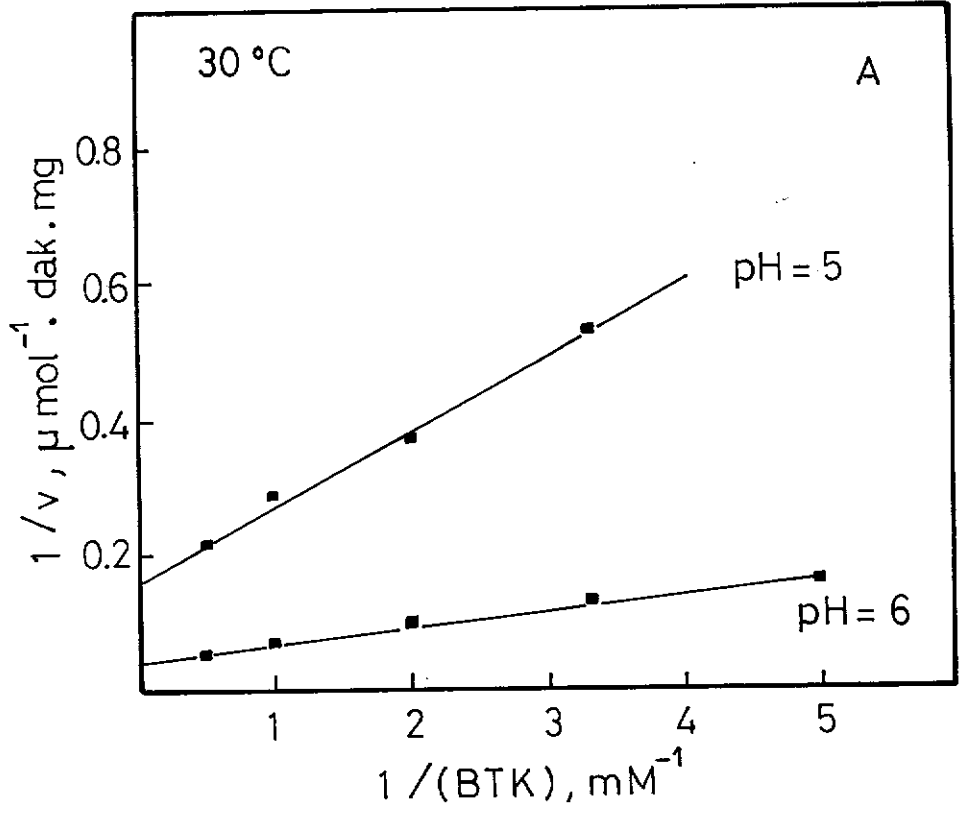
V_m gör. değerlerine karşılık pH değerleri grafiklendiğinde, pH'nın artmasıyla V_m gör. değerlerinin arttığı ve V_m değerine ulaştığı görüldü (Şekil-8A, Şekil-9A, Şekil-10A). $V_m/2$ değerlerine karşı gelen pH değerleri, pK_{es1} 'ler, diğer bir deyişle enzim-substrat kompleksinin çalışılan sıcaklıklardaki pK değerleri saptandı. Sırasıyla, 25°C, 30°C ve 37°C için pK_{es1} değerleri 6.55, 6.5 ve 6.6 olarak bulundu.

Ayrıca 25°C, 30°C ve 37°C'da V_m gör. / K_s gör. oranları hesaplandı (Tablo-Ia, Tablo-Ib, Tablo-Ic). V_m gör. / K_s gör. oranlarına karşı pH değerleri grafiklendiğinde, pH'nın artmasıyla bu oranın arttığı ve V_m/K_s değerine ulaştığı görüldü (Şekil-8B, Şekil-9B, Şekil-10B). $V_m/2$ K_s değerlerine karşı gelen pH değerleri, pK_{e1} 'ler, diğer bir deyişle enzimin aktivitesinden sorumlu prototropik gruplardan birine ait, çalışılan sıcaklıklardaki, pK değerleri saptandı. Sırasıyla 25°C, 30°C, ve 37°C için pK_{e1} değerleri 7.6, 7.5 ve 7.4 olarak bulundu.

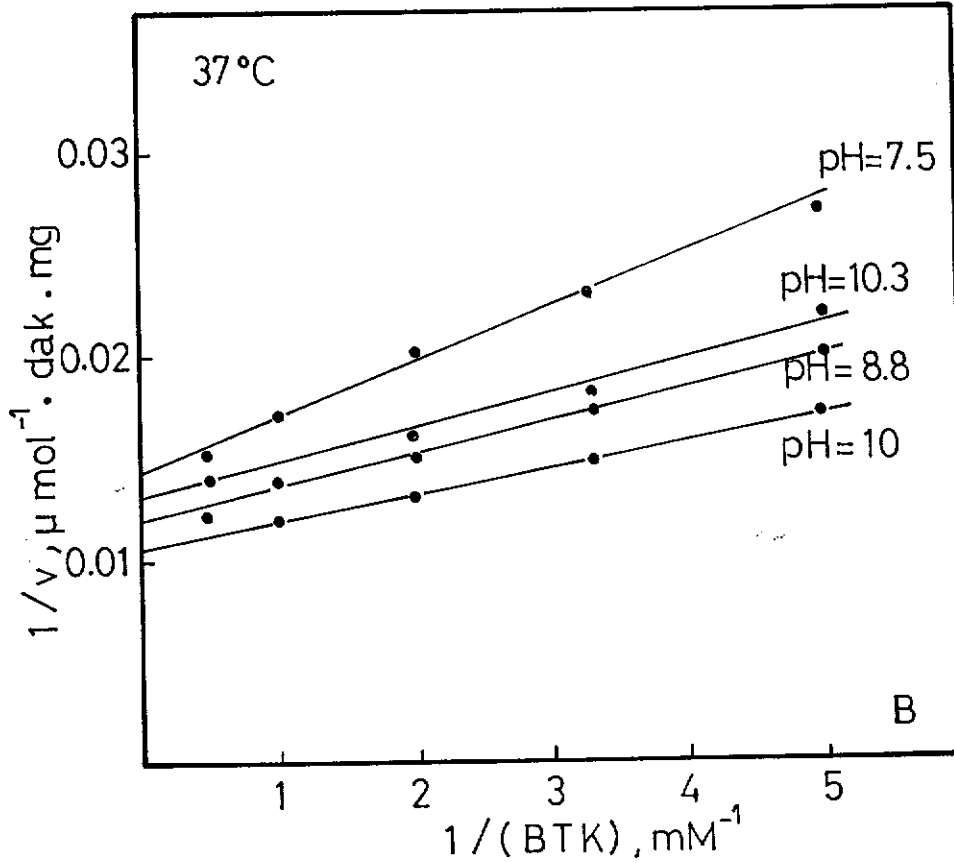
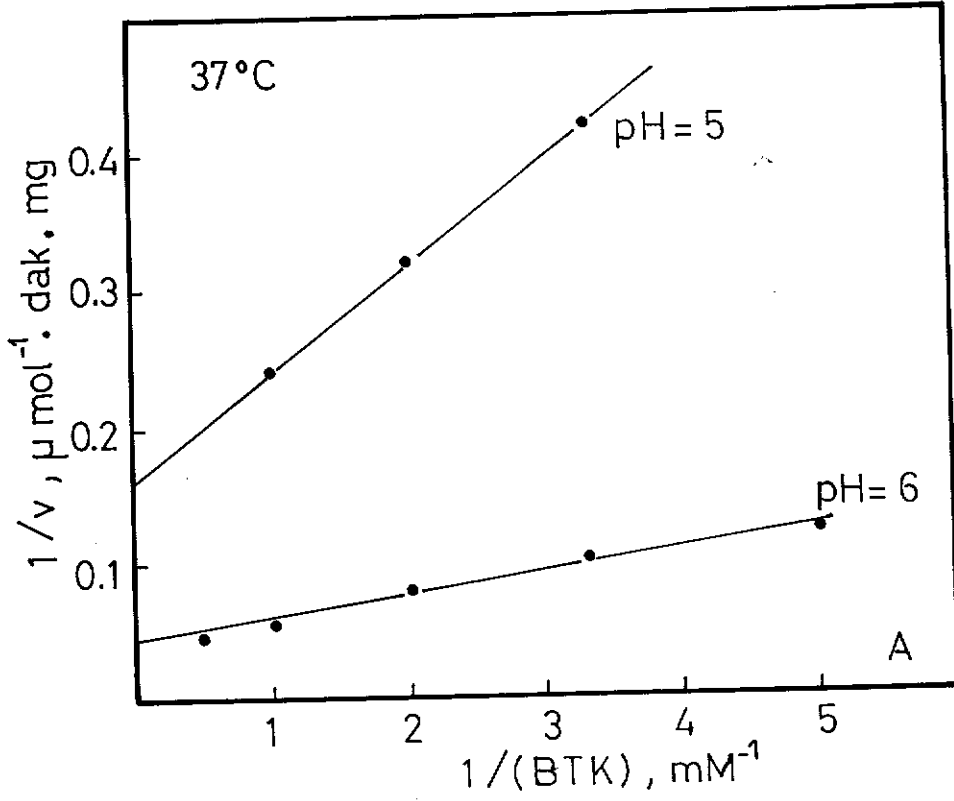
Grafiklerden elde edilen pK_{es1} ve pK_{e1} değerleri 6.5-7.6 arasında değişmektedir. Bu da enzimin aktivitesinden sorumlu prototropik gruplardan birinin histidin amino asidinin imidazol halkası olduğunu göstermektedir (39).



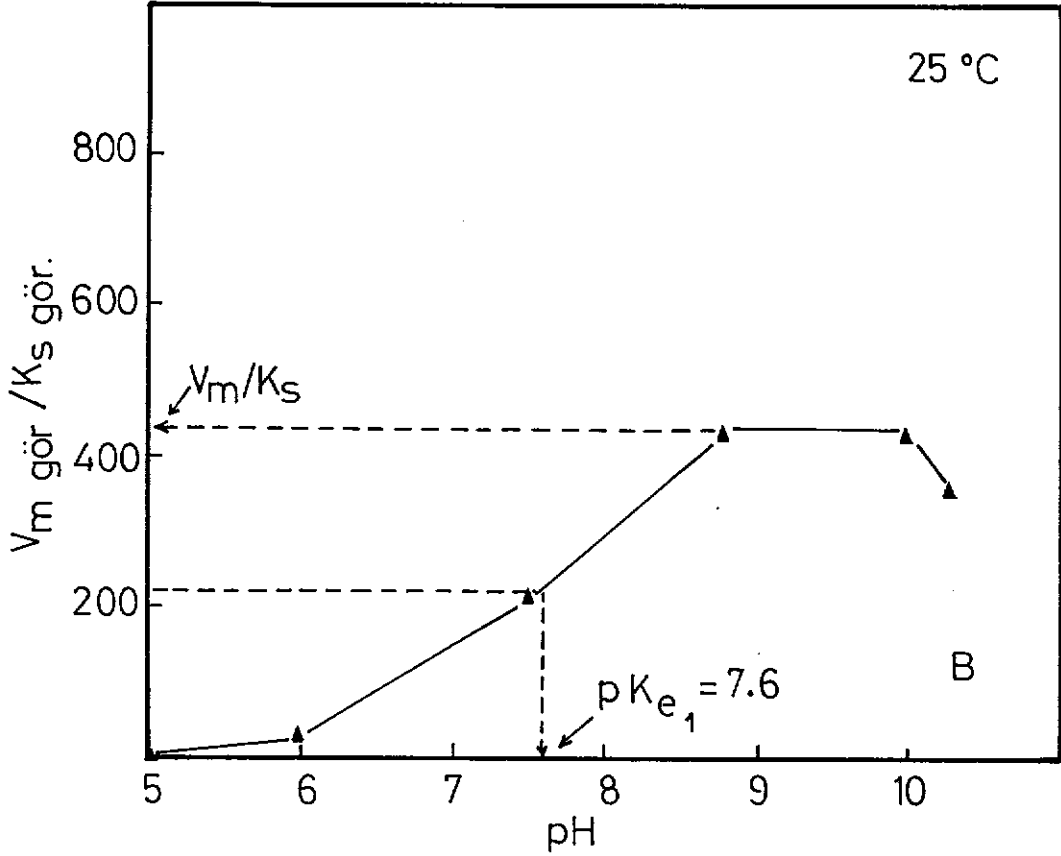
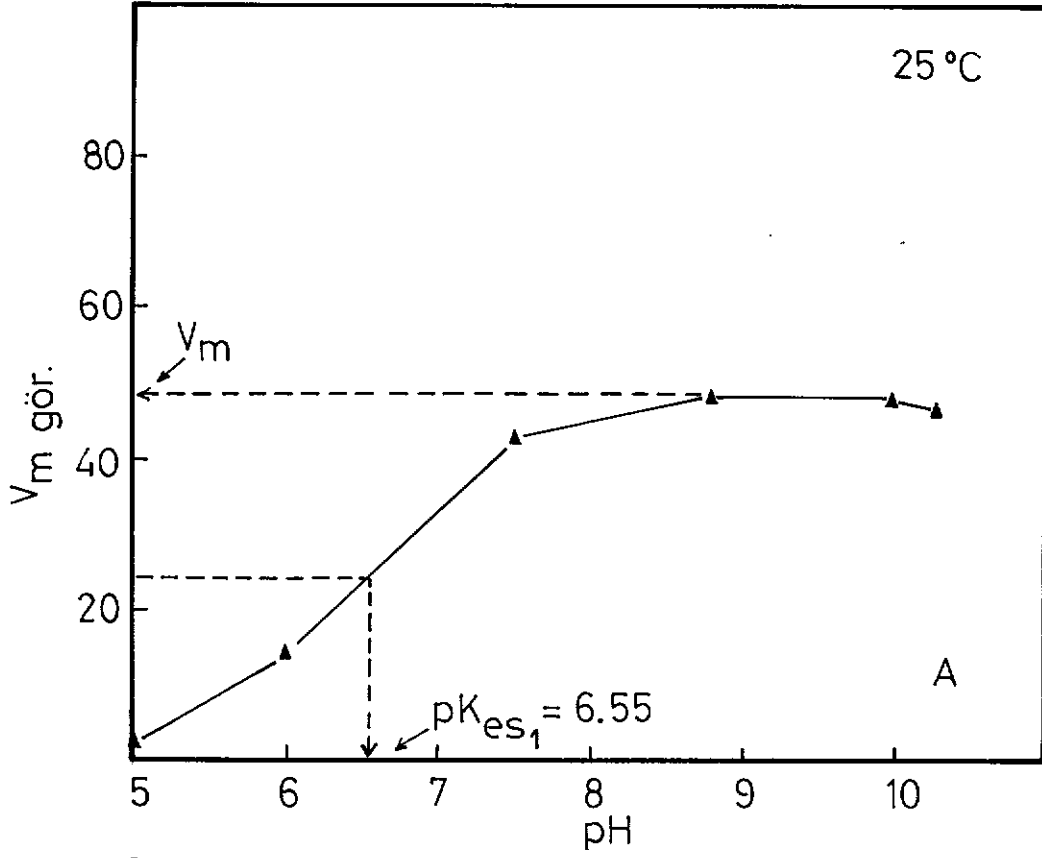
Şekil-5 A ve B : Çeşitli pH'larda PKE için elde edilen Lineweaver-Burk doğruları. Aktiviteler 10 mM KPO_4 tamponu içeren deney karışımları kullanılarak, 25°C'da ölçüldü.



Şekil-6 A ve B : Çeşitli pH'larda PKE için elde edilen Lineweaver-Burk doğruları. Aktiviteler 10 mM KPO_4 tamponu içeren deney karışımları kullanılarak, 30°C'da ölçüldü.

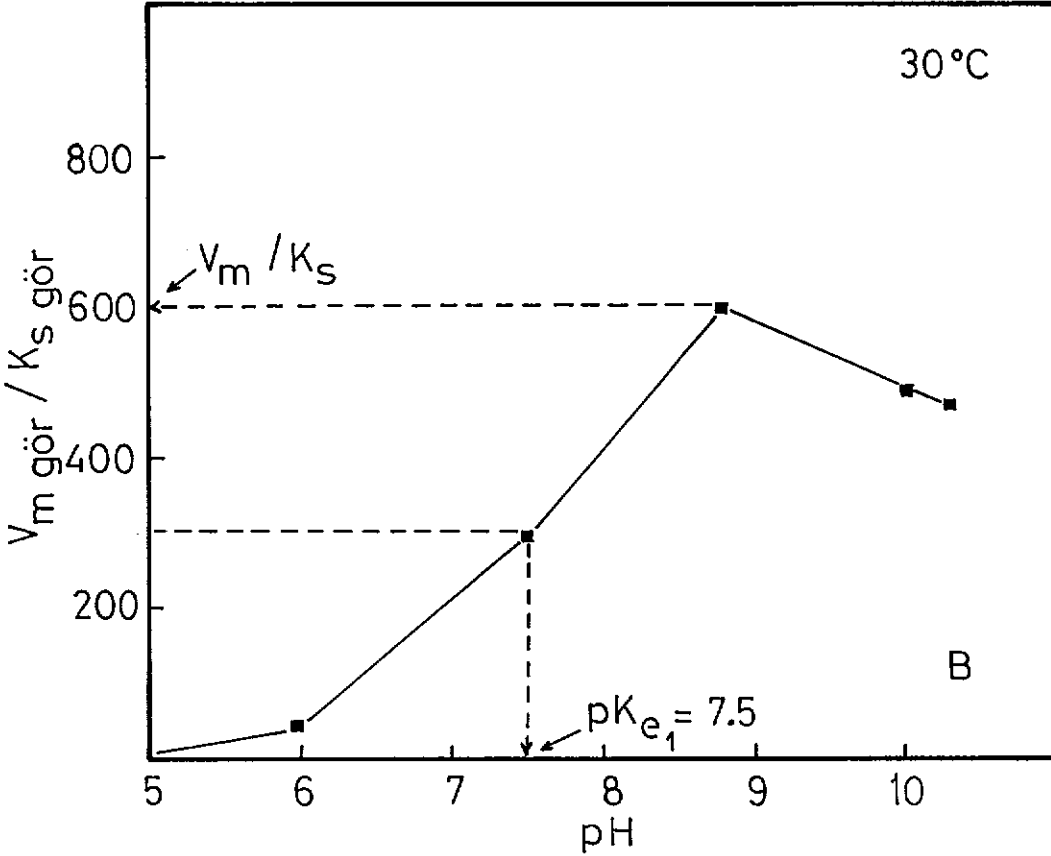
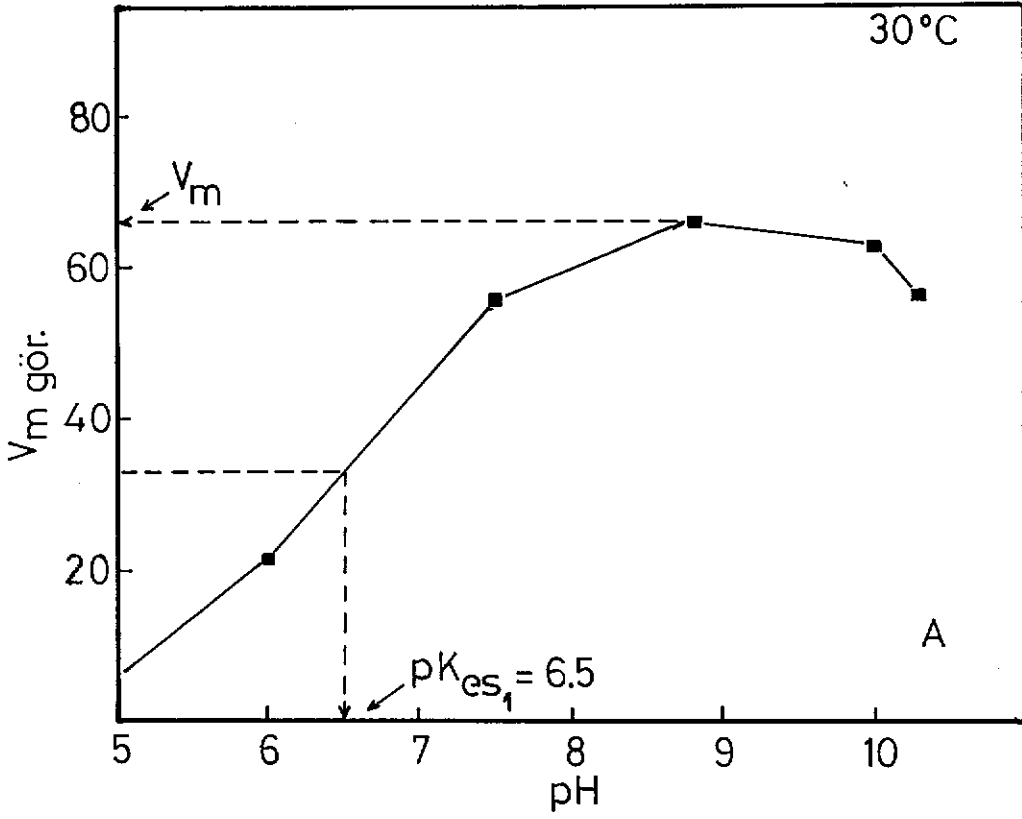


Şekil-7 A ve B : Çeşitli pH'larda PKE için elde edilen Lineweaver-Burk doğruları. Aktiviteler 10 mM KPO_4 tamponu içeren deney karışımları kullanılarak, 37°C'da ölçüldü.



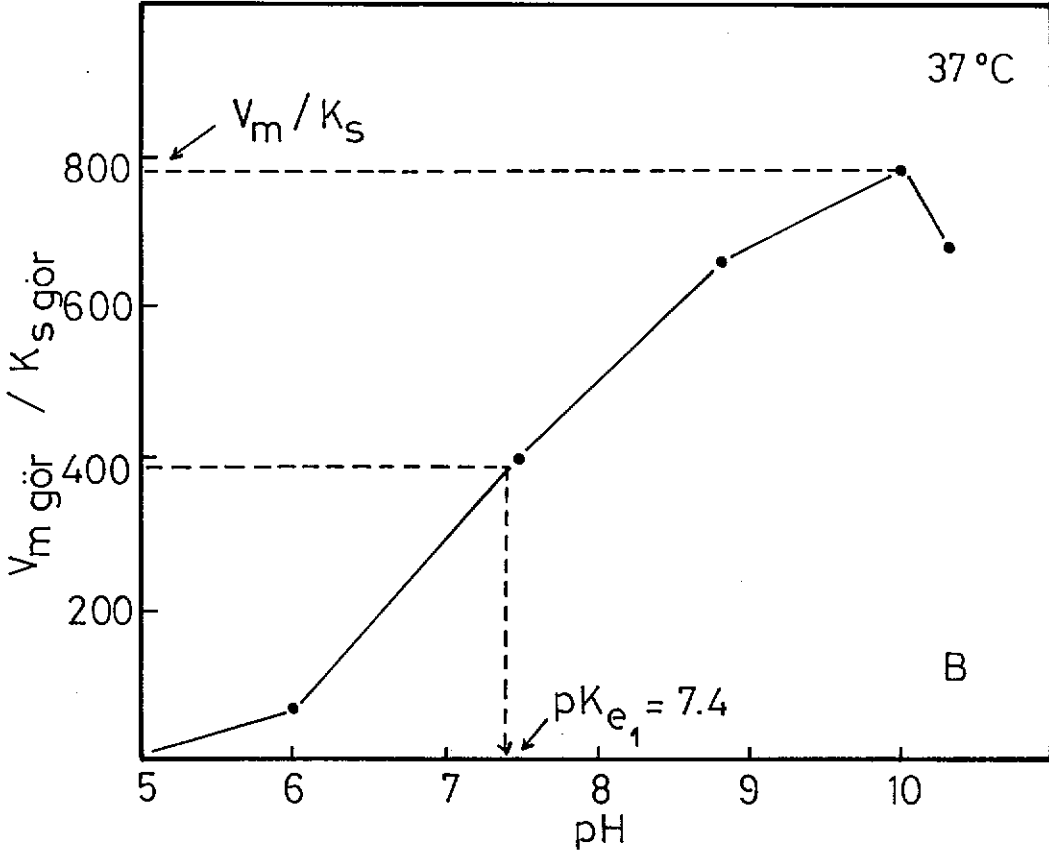
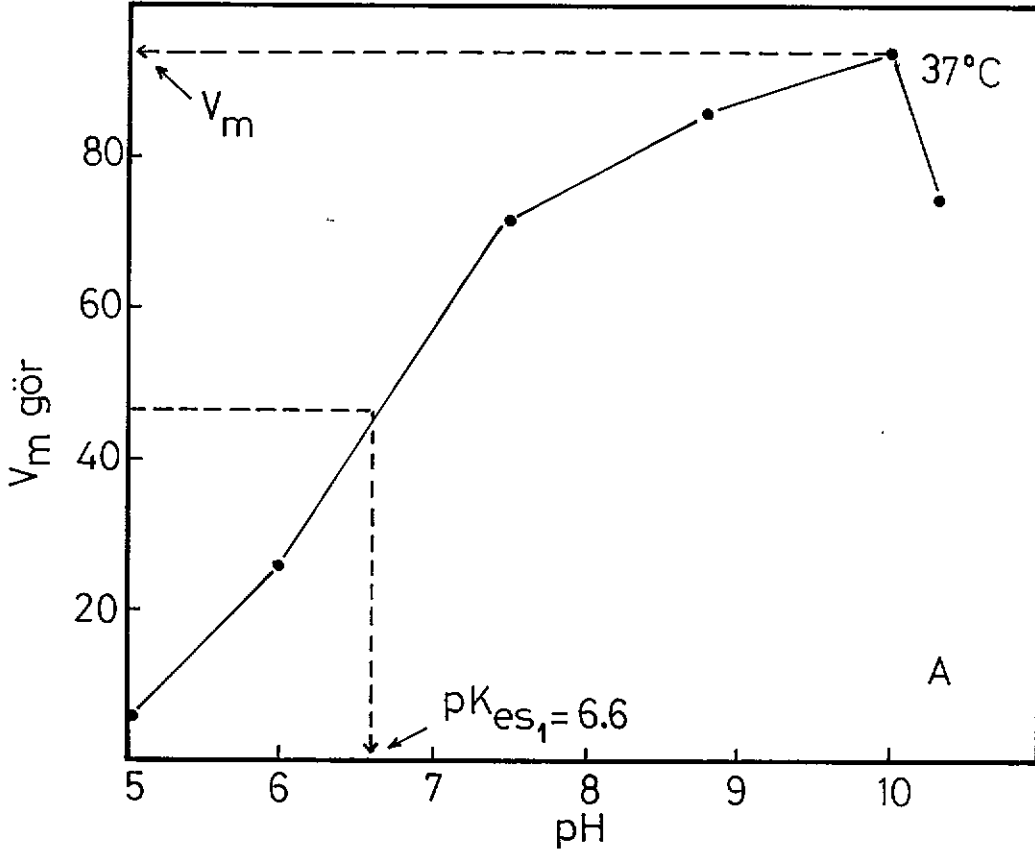
Şekil-8A : 25°C'da, pH'nın PKE'nin V_m gör. değeri üzerine etkisi.

B : Aynı sıcaklıkta, pH'nın PKE için hesaplanan V_m gör. / K_s gör. oranına etkisi.



Şekil-9A : 30°C'da, pH'nın PKE'nin V_m gör. değeri üzerine etkisi.

B : Aynı sıcaklıkta, pH'nın PKE için hesaplanan V_m gör. / K_s gör. oranına etkisi.



Şekil-10A : 37°C'da, pH'nın PKE'nin V_m gör. değeri üzerine etkisi.

B : Aynı sıcaklıkta, pH'nın PKE için hesaplanan V_m gör. / K_s gör. oranına etkisi.

Tablo-Ia : PKE'nin 25⁰C'da çeşitli pH'larda saptanan kinetik sabitleri.

pH	V _m gör. (μ mol / dak / mg)	K _s gör. (mM)	V _m gör. / K _s gör.
5.0	2.88	0.35	8.23
6.0	14.24	0.42	33.90
7.5	43.19	0.20	215.95
8.8	47.91	0.11	435.54
10.0	47.62	0.11	432.90
10.3	46.94	0.13	361.07

Tablo-Ib : PKE'nin 30⁰C'da çeşitli pH'larda saptanan kinetik sabitleri.

pH	V _m gör. (μ mol / dak / mg)	K _s gör. (mM)	V _m gör. / K _s gör.
5.0	6.14	0.67	9.16
6.0	22.12	0.53	41.73
7.5	56.21	0.19	295.84
8.8	66.22	0.11	602.00
10.0	63.29	0.13	486.84
10.3	56.98	0.12	474.83

Tablo-Ic : PKE'nin 37⁰C'da çeşitli pH'larda saptanan kinetik sabitleri.

pH	V _m gör. (μ mol / dak / mg)	K _s gör. (mM)	V _m gör. / K _s gör.
5.0	6.18	0.48	12.87
6.0	25.31	0.43	58.86
7.5	71.43	0.18	396.83
8.8	85.47	0.13	657.46
10.0	93.98	0.12	783.16
10.3	74.62	0.11	678.36

Enzimlerin aktivitelerinden sorumlu prototropik gruplar, standart ionizasyon entalpilerinin, ΔH_{ion}^0 değerlerinin, saptanması ve bu konuda hazırlanmış cetvellerle karşılaştırılması ile bulunabilir (39).

ΔH_{ion}^0 değerleri iki yoldan saptanabilir:

a) T_1 ve T_2 'deki K_1 ve K_2 limit değerleri arasında integre edilmiş van't Hoff eşitliğinden.

$$pK_1 - pK_2 = \frac{\Delta H^0}{2.303 R} \frac{T_2 - T_1}{T_1 T_2}$$

Eşitlikte ΔH^0 standart entalpi değişikliği; R ise gaz sabitidir (1.98 kal. mol⁻¹.derece⁻¹).

b) Aşağıdaki eşitliğe göre iki ya da daha fazla temperatur için bulunan $-\log K_{eq}$ değerleri 1/T'lere karşı grafiklenir.

$$-\log K_{eq} = \frac{\Delta H^0}{2.303 R} \frac{1}{T} - \frac{\Delta S^0}{2.303 R}$$

Eşitlikte ΔS^0 , standart entropi değişikliğidir.

Çalışmada 25°C, 30°C ve 37°C için saptanan pK_{e1} değerleri 1/T'lere karşı grafiklendi ve $\Delta H_{ion}^0 = 6.9$ Kkal/mol olarak hesaplandı.

Hesaplanan ΔH_{ion}^0 değeri, aktif merkezinde prototropik gruplara sahip enzimler için verilen değerlerle karşılaştırıldığında histidin amino asidi içeren bir enzimdeki imidazol halkasının protonunun ionlaşması ile ilgili H_{ion}^0 değerine uyduğu bulundu.

Tablo-Ia, Tablo-Ib ve Tablo-Ic'de en yüksek V_m gör. değerine karşı gelen pH'lar, V_m gör.'lerin saptandığı sıcaklıklar için optimum pH'larıdır ve aşağıdaki eşitlikle verilir :

$$pH_{opt.} = \frac{pK_{e1} + pK_{e2}}{2}$$

Optimum pH'lar 25°C için, 8.8; 30°C için, 8.8; 37°C için 10.0'dur. Bu değerler ve aynı sıcaklıklar için Şekil-8B, Şekil-9B ve Şekil-10B'den bulunan pK_{e1} değerleri, yukardaki eşitlikte yerlerine konarak, pK_{e2} değerleri 25°C için, 10.0; 30°C için 10.1; 37°C için 12.6 olarak hesaplandı.

Hesaplanan değerler, 10.0-12.6 arasındadır ve hesaplanan sıcaklıklar için, PKE'nin aktivitesinden sorumlu prototropik gruplardan bir diğere sahip serin amino asidinin -OH grubuna ait olabilir.

Elde edilen bulgular enzimin aktivitesinde bir histidin ve bir de serinin rol oynadığını göstermektedir.

PKE'nin Aktivasyon Enerjisinin Saptanması (39) :

Tepkimenin aktivasyon enerjisi, aşağıda verilen Arrhenius eşitliğinden yararlanarak bulundu :

$$k = A e^{-E_a/RT}$$

Eşitlik lineer formda şu şekilde verilebilir :

$$\log k = - \frac{E_a}{2.303 R} \frac{1}{T} + \log A$$

Eşitlikte E_a , aktivasyon enerjisi; A, Arrhenius katsayısı ve k da tepkimenin spesifik hız sabitidir.

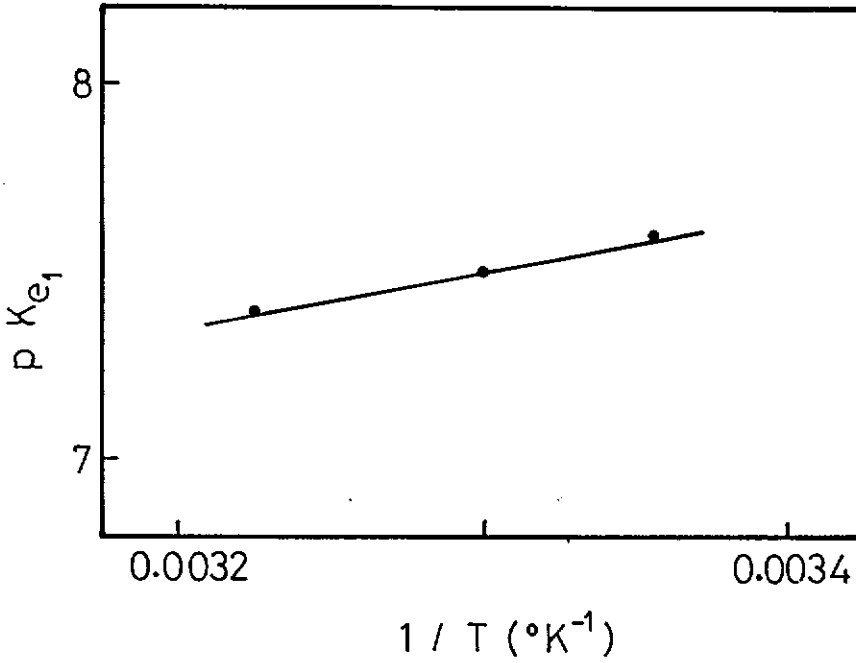
E_a , log k ile 1/T arasında çizilen doğrunun eğiminden hesaplanabilir.

Enzimatik bir tepkimede, spesifik hız sabiti $k_{\text{ü}}$, aşağıdaki eşitlikte gösterildiği gibi, V_m ve ortamdaki enzim konsantrasyonu, $(E)_t$ ile ilişkilidir :

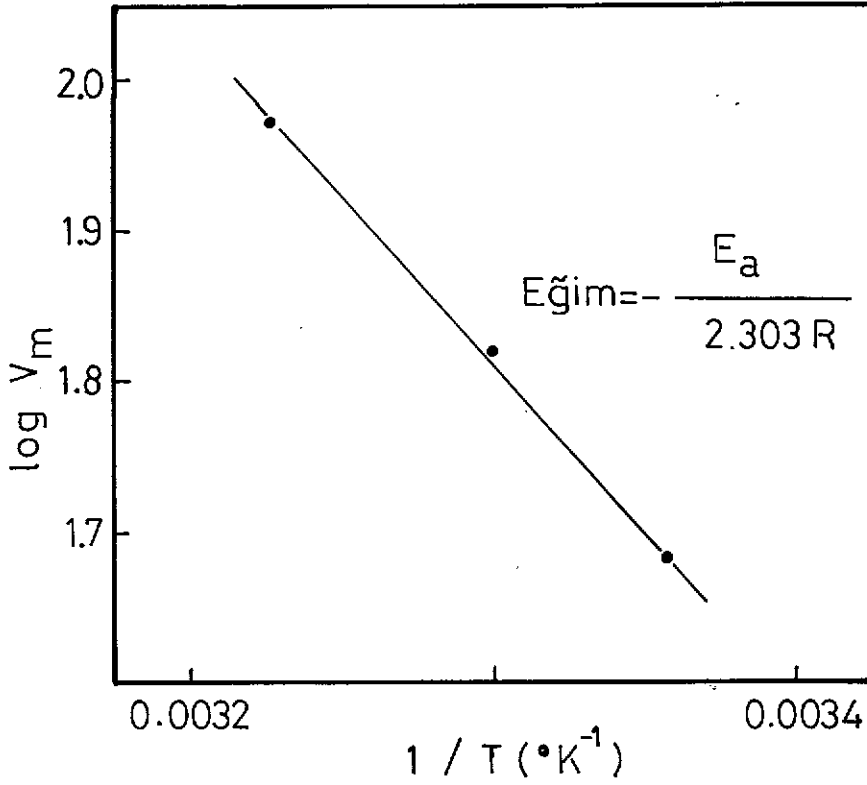
$$k_{\text{ü}} = \frac{V_m}{(E)_t}$$

Bu nedenle, Arrhenius grafiği $\log V_m/(E)_t$ ile $1/T$ arasında ya da $k_{\text{ü}}$, V_m ile orantılı olduğundan, $\log V_m$ ile $1/T$ arasında çizilir.

Çalışmada, $\log V_m$ ile $1/T$ arasında çizilen doğrunun eğiminden (Şekil-12), $E_a = 10.2$ Kkal/mol olarak hesaplandı.



Şekil-11 : PKE için $\Delta H_{\text{ion}}^{\circ}$ değerinin bulunması. Doğrunun eğimi $\Delta H_{\text{ion}}^{\circ} / 2.303 R$ 'ye eşittir.



Şekil-12 : PKE için Arrhenius grafiği.

Inhibisyon Deneyleri (40) :

Lokal anesteziye kullanılan mepivakain ve sitanestin PKE aktivitesi üzerine olan etkisi incelendi ve elde edilen bulgulardan inhibisyon tipi belirlendi.

Aktivite ölçmelerinde 10 mM MOPS tamponu (pH= 7.5) içinde, 2.5×10^{-4} M DTNB, 0.01-4.0 mM arasında değişen BTK ve uygun konsantrasyonlarda mepivakain ya da sitanest içeren deney karışımları kullanıldı. Toplam 1 ml'lik karışıma 9 μg enzim örneği ilave edilerek, 37°C 'da, absorban değişimleri ölçüldü.

Mepivakain inhibisyonu : Çalışmada, 0.15, 0.3 ve 0.6 mM mepivakain kullanıldı. Mepivakain içermeyen ve yukarda belirtilen konsantrasyonlarda mepivakain içeren deney karışımları ile elde edilen v değerleri (S)'lere karşı grafiklendiğinde, daha önce de saptandığı gibi, gerek kontrol eğrisinin gerekse inhibitörlü eğrilerin Michaelis-Menten kinetiğine uymadığı anlaşıldı (Şekil-13).

$1/v$ değerlerine karşı $1/(S)$ 'ler grafiklenerek Lineweaver-Burk doğruları çizildiğinde, kontrol doğrusu ile mepivakain varlığında elde edilen doğruların $1/(S)$ -ekseninin üst tarafında bir noktada kesiştiği gözlemlendi (Şekil-14). Bu bulgu mepivakain inhibisyonunun karışık-tipte (mixed-type) bir inhibisyon olduğunu gösterir.

Şekil-15'de, 4 mM BTK konsantrasyonunda, mepivakain konsantrasyonunun enzimatik hıza olan etkisi görülmektedir. Mepivakain konsantrasyonu arttığında hız azalarak bir limit değere ulaşmaktadır. Bu bulgu karışık inhibisyonun hiperbolik olduğuna işaret eder. Gerçekten de, Şekil-14'den hesaplanan $1/v$ -ekseni kesim noktaları, mepivakain konsantrasyonlarına karşı grafiklendiğinde (Şekil-16A) ya da eğimler, mepivakain konsantrasyonlarına karşı grafiklendiğinde (Şekil-17A) hiperbolik eğriler elde edildi.

Mepivakaine ait β , α ve K_i sabitlerinin saptanabilmesi için, $1/\Delta$ kesim noktaları ve $1/\Delta$ eğim değerleri, $1/(\text{mepivakain})$ değerlerine karşı grafiklenerek, hiperbolik eğriler doğruya dönüştürüldü (Şekil-16B ve Şekil-17B).

Şekil-16B'de, doğrunun $1/\Delta$ kesim noktaları eksenini kestiği nokta aşağıdaki eşitlikle verilebilir.

$$1/\Delta \text{ kesim noktası} = \frac{\beta V_m}{1-\beta}$$

$1/\Delta$ kesim noktası için grafikten bulunan 85 değeri, V_m için daha önce saptanan $58.8 \mu\text{mol/dak/mg}$ değeri eşitlikte yerlerine konarak $\beta = 0.6$ olarak hesaplandı.

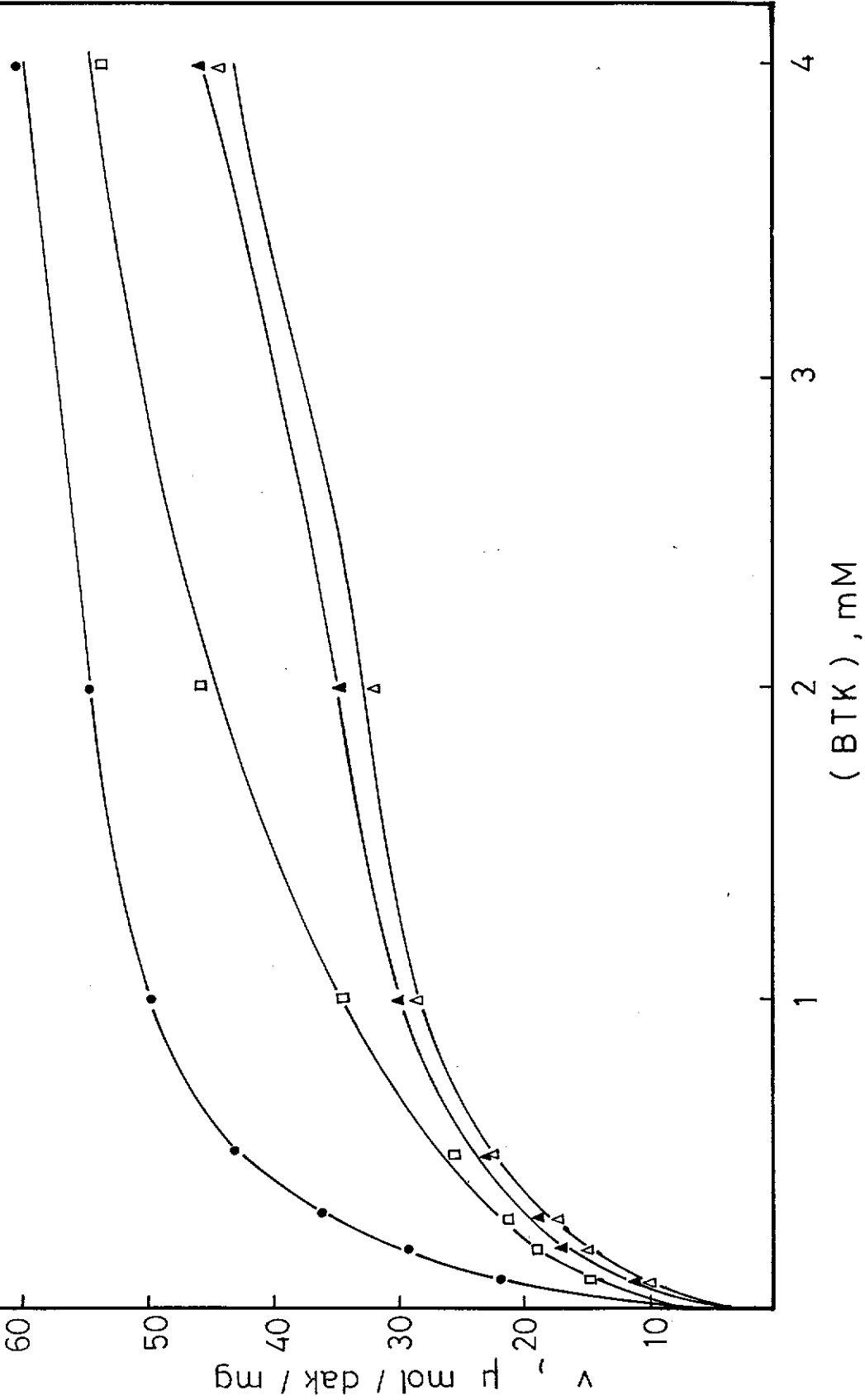
Şekil-17B'deki doğrunun $1/\Delta$ eğim eksenini kestiği noktadan, aşağıdaki eşitlik aracılığı ile α değeri saptandı.

$$1/\Delta \text{ eğim} = \frac{\beta V_m}{K_S (\alpha - \beta)}$$

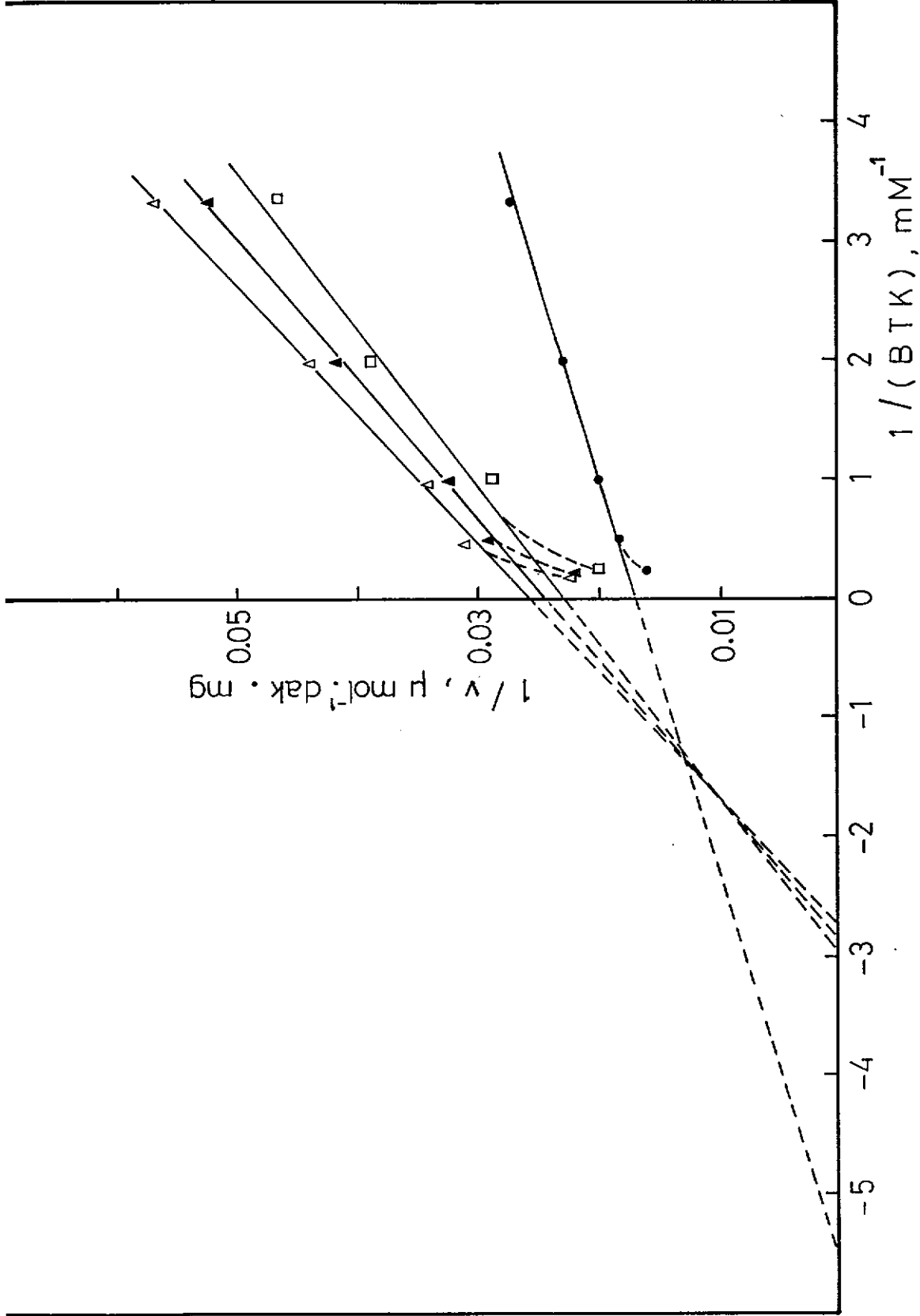
Eşitlikte $1/\Delta$ eğim için grafikten bulunan 144 değeri, V_m , β ve K_S için daha önce saptanan 0.18 mM değerleri yerlerine konularak $\alpha = 1.96$ olarak bulundu.

Şekil-16B ve Şekil-17B'deki doğruların herikisi de $1/(\text{mepivakain})$ eksenini $-\beta/\alpha K_i$ noktasında keserler. Bu nedenle, iki grafik için bulunan değerlerin ortalaması olan 8.94 değeri ayrıca, β ve α değerleri yerlerine konularak $K_i = 0.034 \text{ mM}$ olarak hesaplandı.

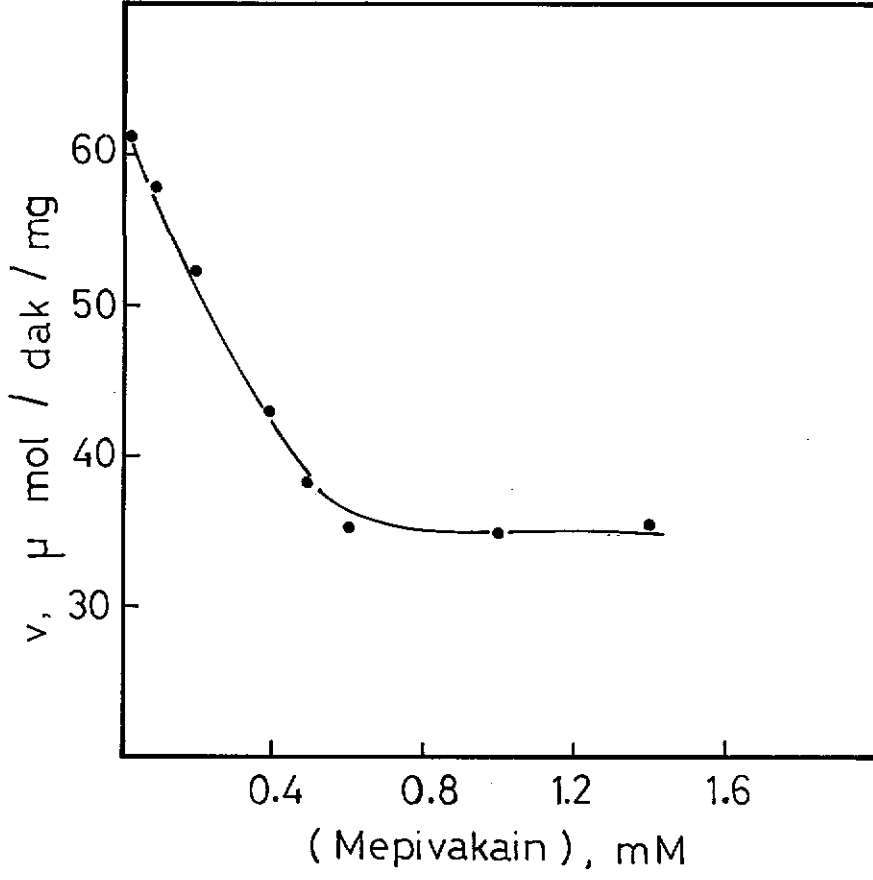
Mepivakain inhibisyonunda $\alpha > 1$ ve $0 < \beta < 1$ 'dir. Elde edilen bulgular, karışık-tipteki inhibisyonun "eğim-hiperbolik, kesim noktası-hiperbolik nonkompetitif inhibisyon" olduğunu gösterir. Bu tip inhibisyon, kısmi kompetitif ve kısmi nonkompetitif inhibisyonun karışımı olarak düşünülür.



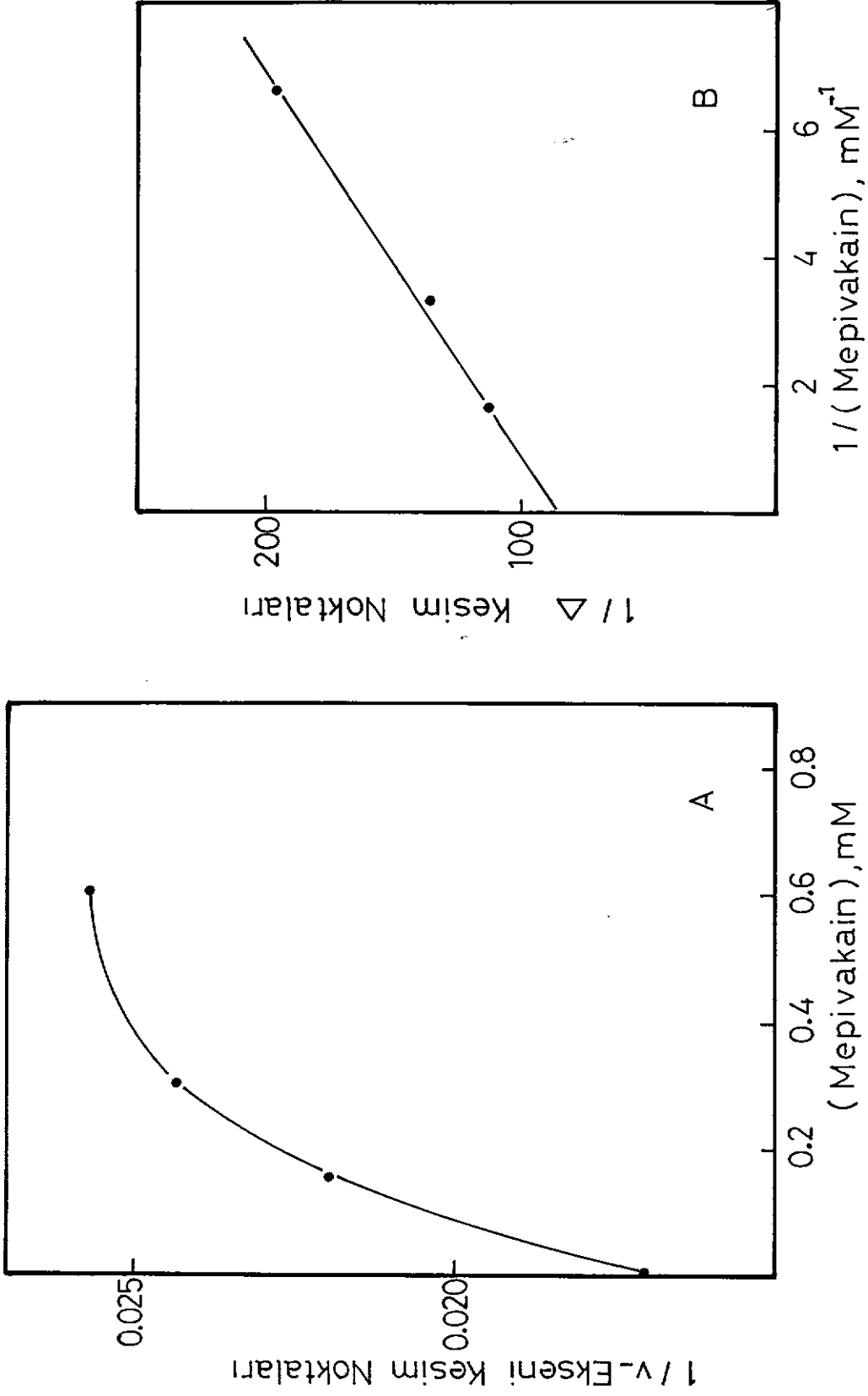
Şekil-13 : BTK konsantrasyonunun PKE aktivitesi üzerine etkisi. (●—●) : Ortamda mepivakain bulunmadığı zaman elde edilen eğriyi (kontrol eğrisi); (□—□) : ortamda 0.15 mM, (▲—▲) : 0.30 mM, (△—△) : 0.60 mM mepivakain bulunduğu zaman elde edilen eğriyi göstermektedir.



Şekil-14 : Lineweaver-Burk grafiği. (●—●): Ortamda mepivakain bulunmadığı zaman elde edilen doğruyu (kontrol doğrusu); (□—□): Ortamda 0.15 mM, (▲—▲): 0.30 mM, (Δ—Δ): 0.60 mM mepivakain bulunduğu zaman elde edilen doğruları göstermektedir.

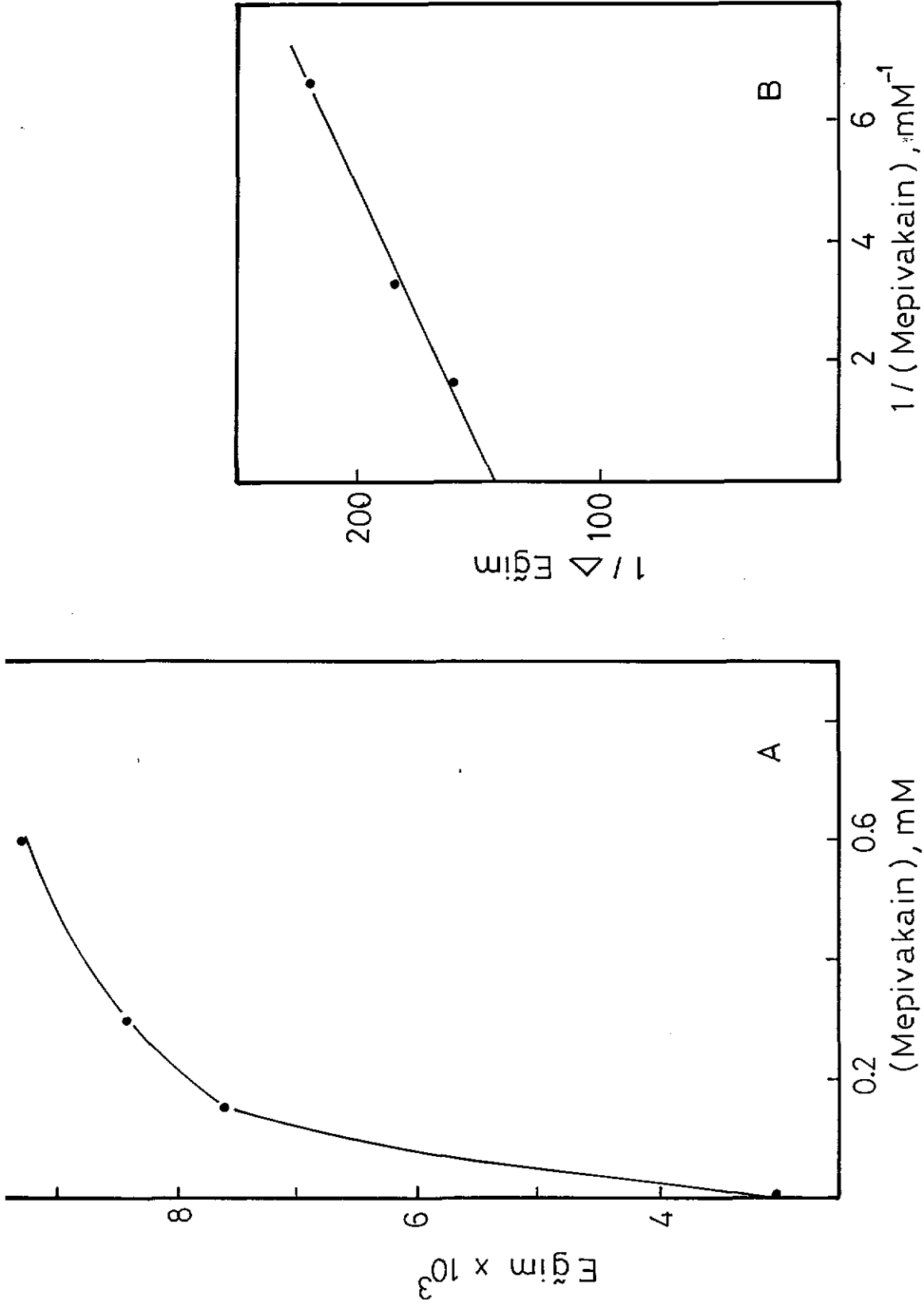


Şekil-15 : Mepivakainin PKE aktivitesi üzerine etkisi
(4 mM BTK konsantrasyonunda çalışılmıştır).



Şekil-16 A : 1/v-ekseni kesim noktalarına karşı mepivakain konsantrasyonları grafiği ve

B : 1/Δ kesim noktalarına karşı 1/(mepivakain) değerleri grafiği.



Şekil-17 A : Eğimlere karşı mepivakain konsantrasyonları grafiği ve
B : 1/Δ eğimlere karşı 1/(mepivakain) değerleri grafiği.

Sitanest İnhibisyonu : Çalışmada 0.2, 0.6, 2.0 ve 6.0 mM sitanest kullanıldı.

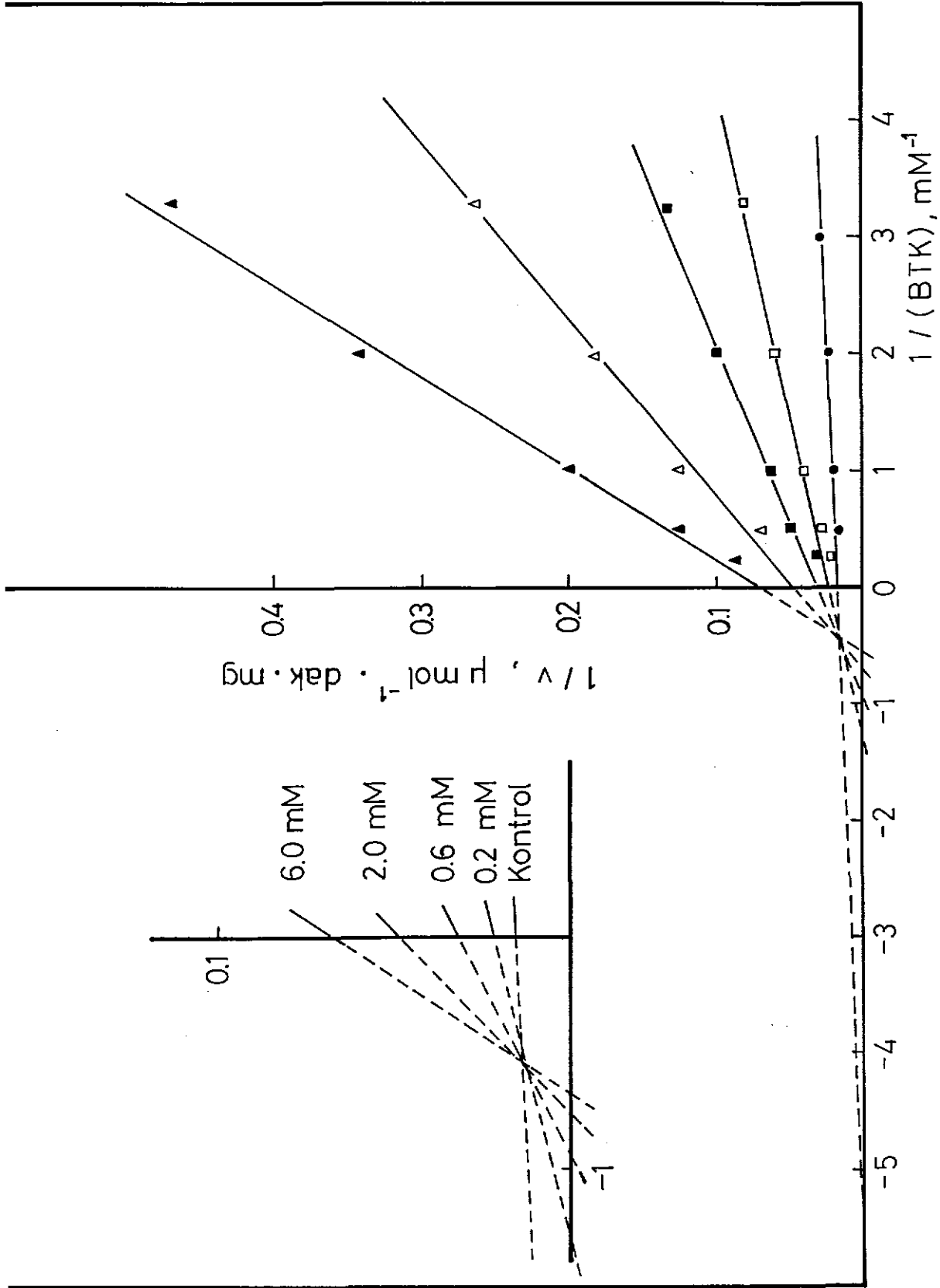
$1/v$ değerlerine karşı $1/(S)$ 'ler grafiklenerek Lineweaver-Burk doğruları çizildiğinde kontrol doğrusu ile, ortamda sitanest bulunduğu elde edilen doğruların, mepivakain inhibisyonunda olduğu gibi, $1/(S)$ -ekseninin üst tarafında bir noktada kesiştiği gözlemlendi (Şekil-18).

4 mM BTK konsantrasyonunda, sitanest konsantrasyonu arttırıldığında, enzimatik tepkime hızının azaldığı ve bir limit değere ulaştığı saptandı (Şekil-19).

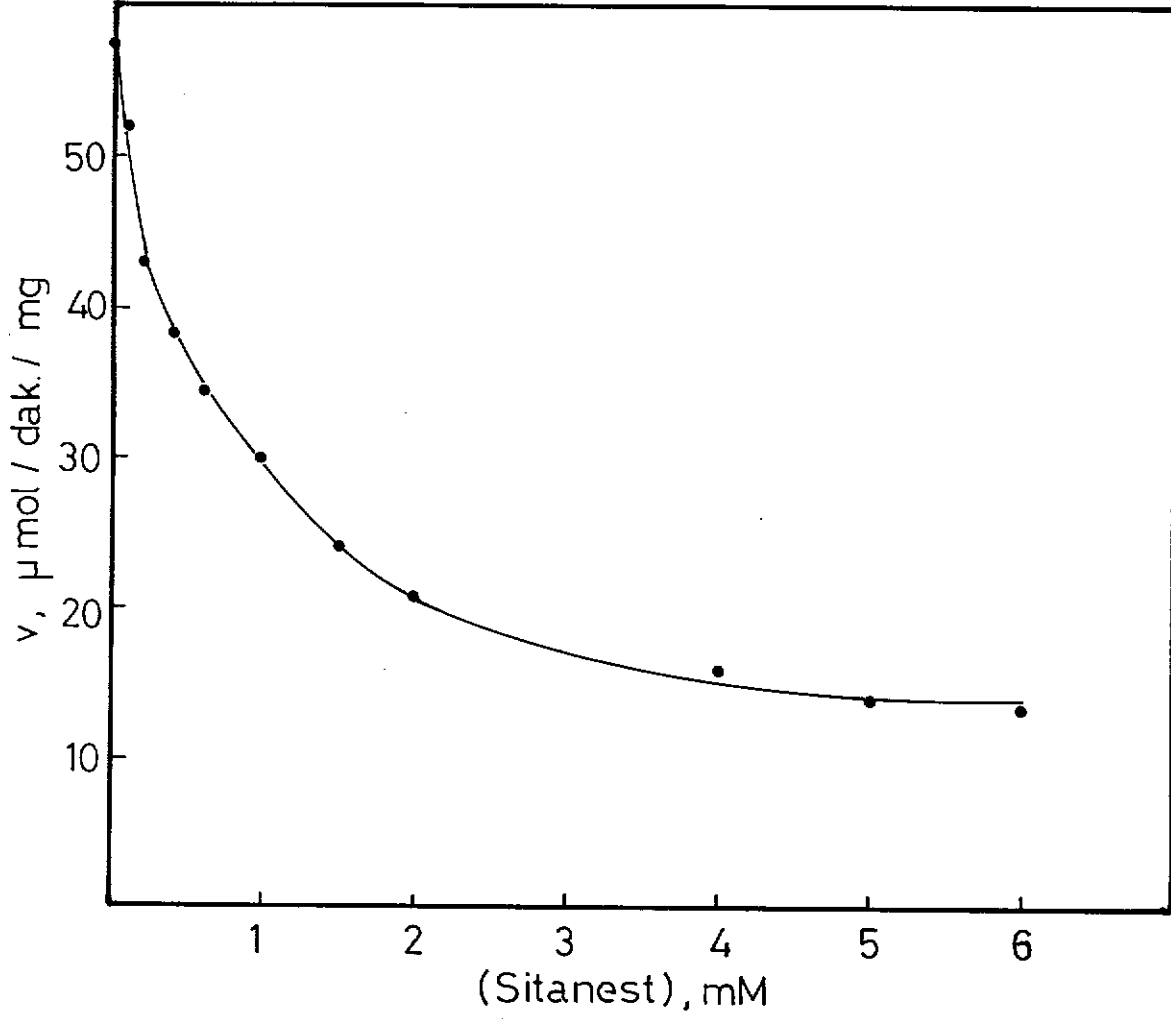
Ayrıca, mepivakain inhibisyonunda olduğu gibi, $1/v$ -ekseni kesim noktaları ya da eğimler, sitanest konsantrasyonlarına karşı grafiklendiğinde hiperbolik eğriler elde edildi (Şekil-20A ve Şekil-21A).

$1/\Delta$ kesim noktaları ve $1/\Delta$ eğim değerleri, $1/(\text{mepivakain})$ değerlerine karşı grafiklenerek (Şekil-20B ve Şekil-21B), sitanest için $\beta = 0.13$, $\alpha = 5$ ve $K_i = 0.06$ mM olarak bulundu.

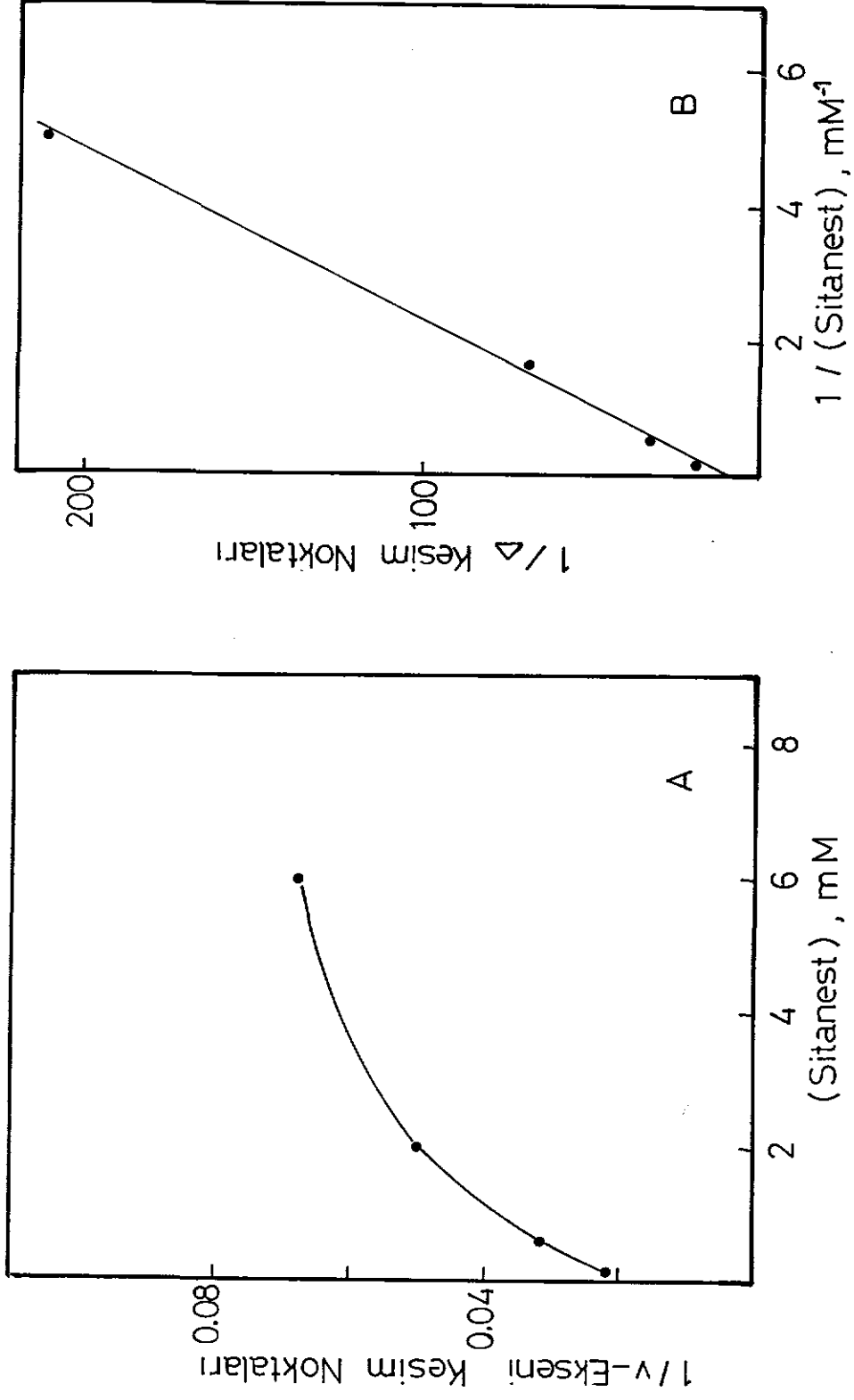
Sonuç olarak sitanest inhibisyonunun da, mepivakainde olduğu gibi "eğim-hiperbolik, kesim noktası-hiperbolik nonkompetitif inhibisyon" olduğuna karar verildi.



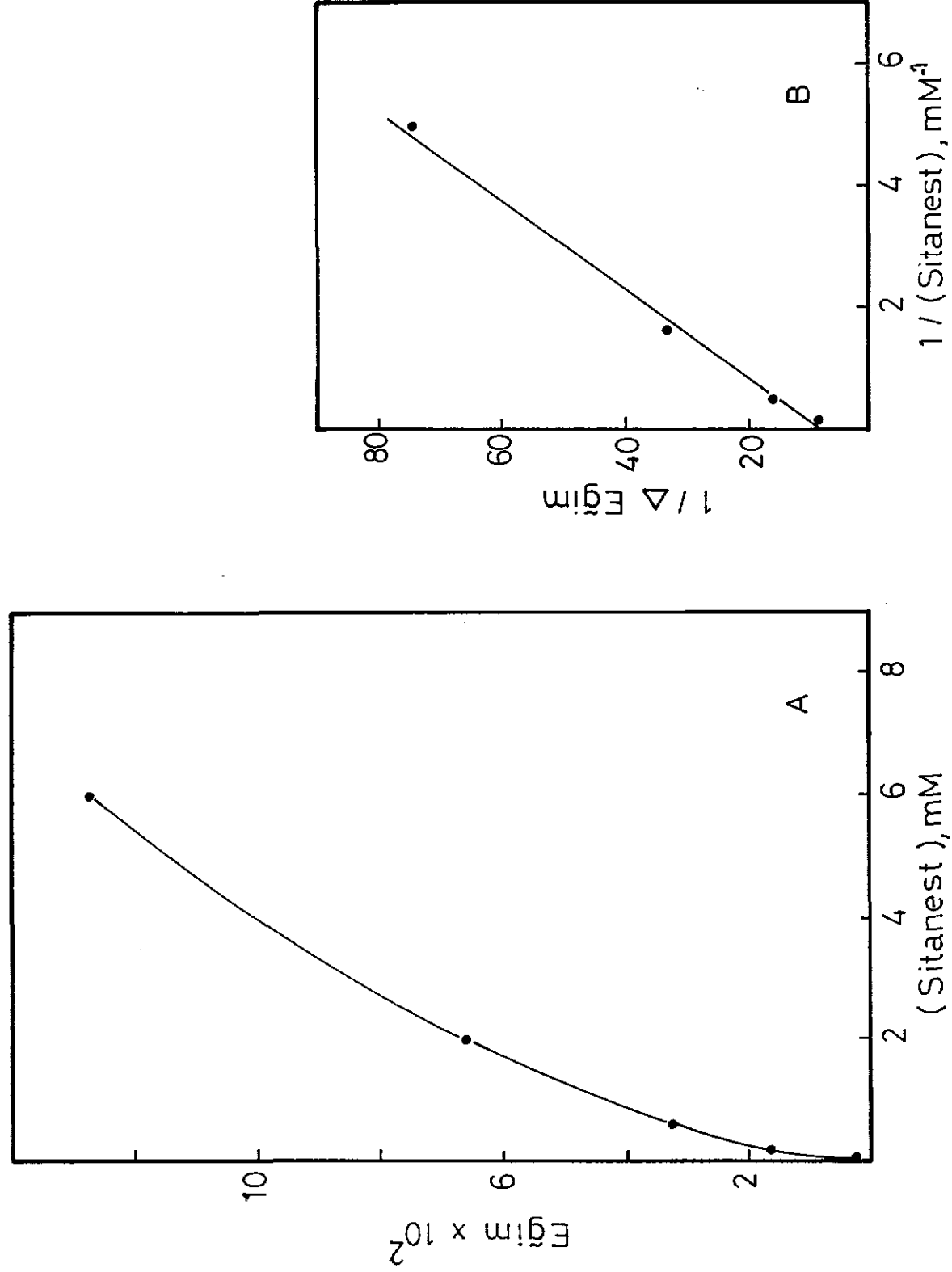
Şekil-18 : Lineweaver-Burk grafiği. (●—●): Ortamda sitanest bulunmadığı zaman elde edilen doğruyu (kontrol doğrusu); (□—□): ortamda 0.2 mM, (■—■): 0.6 mM, (Δ—Δ): 2.0 mM, (▲—▲): 6.0 mM sitanest bulunduğu zaman elde edilen doğruları göstermektedir. Yandaki grafikte doğruların kesiştiği bölge, büyütülerek çizilmiştir.



Şekil-19 : Sitanest'in PKE aktivitesi üzerine etkisi (4 mM BTK konsantrasyonunda çalışılmıştır).



Şekil-20 A: 1/v-ekseni kesim noktalarına karşı sitanest konsantrasyonları grafiği ve B: 1/Δ kesim noktalarına karşı 1/(sitanest) değerleri grafiği.



Şekil-21 A: Eğimlere karşı sitanest konsantrasyonları grafiği ve
B: 1/Δ eğimlere karşı 1/(sitanest) değerleri grafiği.

T A R T I Ş M A

PKE'nin allosterik bir enzim olduğu bilinmektedir (5,29).

Allosterik enzimler (41), sübstratları, ürünleri, sübstrat ve ürünlerine yapıca benzeyen bileşikler dışında, diğer bazı küçük moleküller tarafından da etkilenen, denetlenen oligomerik yapıya sahip enzimlerdir. Denetlenme aktivasyon ya da inhibisyon şeklinde olabilir.

Allosterik enzimlerin aktif ve inaktif şekilleri vardır ve bu şekiller denge halindedir. Pozitif kooperativite gösteren enzimlerde denge, sübstrat ya da aktivatör moleküller tarafından aktif şeklin, inhibitor moleküller tarafından ise inaktif şeklin ortamda artması yönüne kaydırılır. Negatif kooperativite gösteren enzimlerde ise, genel olarak bir molekül sübstratın bağlanması ile oluşan konformasyon değişikliği sonucu, enzimin ikinci sübstrat molekülüne olan afinitesi azalır.

Yukarıda anlatıldığı gibi allosterik bir enzime bağlanarak, aktif merkezin konformasyonunda ve enzimin kinetik özelliğinde değişikliklere yol açan sübstrat, aktivatör, inhibitör gibi küçük moleküllere allosterik denetleyiciler ya da allosterik modifikatörler adı verilir.

PKE için bölümümüzde yapılan çalışmalarla aktif merkez dışında, modifikatör moleküllerin bağlanabileceği, allosterik merkezlerin varlığı gösterilmiştir (29).

PKE'nin fluorür, kuarterner ammonyum içeren bileşikler, süksinilkolin

ve bazı lokal anestetikler tarafından tersinir, organofosfat, organosulfonat ve karbamatlar tarafından ise tersinmez olarak inhibe edildiği gösterilmiştir (5). Bununla beraber, inhibitör ve aktivatörlerinin etki mekanizmalarını açıklayan etraflı kinetik çalışma sayısı çok azdır (2,4,10, 42,43).

Sunulan çalışmada sübstrat olarak BTK kullanıldı. BTK dışında bütirilkolin, β -hidroksi bütirilkolin, benzoilkolin ve o-nitrofenilbütirat da substrat olarak kullanılabilir (5,23,33).

PKE'nin allosterik bir enzim olması nedeniyle aktivite ölçmelerinde, renklendirmede kullanılan DTNB'nin konsantrasyonu 2.5×10^{-4} M, KPO_4 ve MOPS tamponlarının konsantrasyonları ise 10 mM gibi düşük bir seviyede tutularak, moleküler etkileri azaltılmağa çalışıldı.

Substratın enzimatik aktivite üzerine olan etkisi -pH, temperatur ve inhibisyon deneylerinin kontrolünü oluşturmak üzere- iki ayrı tampon, 10 mM KPO_4 ve 10 mM MOPS (pH= 7.5) içeren ortamda, $37^{\circ}C$ 'da incelendi (Şekil-1) ve PKE'nin Michaelis-Menten kinetiğine uymadığı gösterildi. $(S)_{0.75} / (S)_{0.5}$ oranının, KPO_4 içeren ortamda 4, MOPS içeren ortamda 3.6 olması ve ayrıca Hill sabitlerinin KPO_4 içeren ortam için 0.8, MOPS içeren ortam için 1.1 olarak saptanması, enzimin substratına karşı hafifçe negatif kooperativite gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Hill sabiti, n_H sübstrat bağlama bölgelerinin sayısını gösterir. Enzimin dört alt birimden oluştuğu ve her alt birimde en az bir substrat bağlama bölgesinin bulunduğu bilinmektedir (23,44,45). Bu bulguların ışığında n_H değerinin birin üzerinde olması beklenirken, 0.8 ya da 1.1 olması ancak, PKE'nin substratına karşı negatif kooperativite göstermesi ile

açıklanabilir. Birinci substrat molekülünün bağlanması ile enzimde meydana gelen konformasyon değişikliği, ikinciye olan afiniteyi azaltmakta ve Hill grafiği (Şekil-3), bir sübstrat bağlayan bir enzimin davranışına uymaktadır.

Takriben 2 mM BTK konsantrasyonunun üzerinde ise substrat aktivasyonu gözlenmektedir (Şekil-1).

İki ayrı tamponla çalışılarak elde edilen Lineweaver-Burk doğrularından, 37°C için, pH= 7.5'da PKE'nin V_m gör. ve K_S gör. değerleri saptandı (Şekil-2). KPO_4 içeren ortamda, V_m gör. = 71.4 μ mol/dak/mg, K_S gör. = 0.18 mM; MOPS tamponu içeren ortam için V_m gör. = 58.8 μ mol/dak/mg, K_S gör. = 0.18 mM olarak hesaplandı.

Görüldüğü gibi, ortamda bulunan iki ayrı bileşiğin enzim üzerindeki moleküler etkisi ile yalnız V_m gör. değeri değişmiş, enzimin sübstratına olan afinitesi K_S gör. ise değişmemiştir.

Allosterik enzimlerle ilgili başlıca kinetik kavramlar yatışkın durum (Steady-state) yaklaşımı karmaşık sonuçlara yol açtığından, hızlı denge (rapid-equilibrium) yaklaşımı ile açıklanır. Bu nedenle K_m sabiti K_S değerine dönüşür.

Enzimin aktivitesinden sorumlu olan prototropik grupların saptandığı pH deneyleri 25°C, 30°C ve 37°C olmak üzere üç temperatürde yapıldı ve aktiviteler enzimin denatüre olmadığı pH aralığında, pH= 5 ile pH= 10.3 arasında ölçüldü.

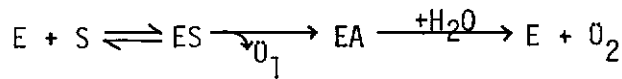
PKE'nin aktif merkezinde bulunan grupların saptanması ile ilgili çalışmalar 1950'lere dayanır (24). Asetilkolinesterazın aktif merkezinin

anyonik ve esteratik bölgelerden oluştuğu fikri ortaya atıldıktan sonra, bu hipotez PKE için de önem kazanmış ve araştırmalar bu yöne kaydırılmıştır.

Pavlic (46), PKE'nin esteratik bölgesindeki grupların dissosiasyon sabitlerini, enzimi metansulfonil fluorür ile sulfonilleyerek saptamağa çalıştı ve sulfonillenme ile pH arasındaki ilişkinin bir çan-eğrisi (bell-shaped) olduğunu bularak, buradan $pK_1 = 6.2$ ve $pK_2 = 10.1$ olmak üzere iki dissosiasyon sabiti buldu. O günkü bilgiler içinde pK_1 'in histidinin imidazol halkasına, pK_2 'nin ise tirozine ait olduğu ileri sürüldü.

Daha sonraları radyoaktif işaretli inhibitörler kullanılarak, esteratik bölgede yer alan bir serin amino asidinin katalitik aktiviteden sorumlu olduğu gösterildi (18,23).

Enzimatik tepkime için aşağıdaki basit tepkimeler dizisi verilebilir (33).



Burada E, serbest enzimi; ES, enzim-substrat kompleksini; EA, açil-enzimi; O_1 , sübstratın alkol ya da fenol yapısındaki ürününü, O_2 ise asit yapıdaki ürünü gösterir. Açilenzim, aktif merkezdeki serine açil grubunun bağlanması ile oluşmaktadır.

Ancak, anyonik bölgedeki glutamik asidin katalitik aktivitedeki yeri ile ilgili bilgiler yeterli değildir (5).

Glutamik aside ait karboksil grubunun pK_a 'sı 3-5 arasındadır ve fizyolojik pH'da protonu dissosiyeye olduğundan, negatif yüklüdür.

PKE o-nitrofenilbütirat gibi nötral sübstratları da kullanabilir. Bu nedenle, glutamik asidin aktiviteden sorumlu olduğu söylenemez. Fakat, enzimin pozitif yüklü kolin esterlerine olan afinitesinin daha fazla olması, karboksil grubunun enzim-sübstrat kompleksinin oluşmasını kolaylaştırdığını gösterir.

Sunulan çalışmadaki pH ve temperatur deneylerinin amacı, enzimin aktivitesinden sorumlu prototropik grupları, liteartürden farklı bir yöntemle saptamak ve özellikle serinin -OH grubuna ait dissosiasyon sabitini bulmaktır.

Sunulan bilgilerin ışığında, PKE için pH-enzim aktivitesi ilişkisinin (Ek bilgiler-I)'de verilen mekanizmaya uyduğuna karar verildi.

Hız eşitliğinden yararlanarak çizilen grafikler aracılığıyla kinetik sabitler (Tablo-Ia, Tablo-Ib ve Tablo-Ic) ve prototropik gruplar için pK değerleri saptandı (Tablo-II).

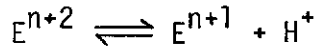
Tablo-II. PKE'nin aktif merkezindeki prototropik grupların, çeşitli sıcaklıklarda saptanan pK değerleri.

Sıcaklık	pK _{e1}	pK _{es1}	pK _{e2}
25°C	7.6	6.55	10.0
30°C	7.5	6.50	10.1
37°C	7.4	6.60	12.6

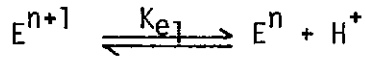
Tablo-II'den de görüldüğü gibi, pK_{e1} ve pK_{es1} değerleri 6.5-7.6 arasında değişmekte ve histidin imidazol halkasındaki protonun dissosiasyonu ile ilgili pK değerine uymaktadır (39). Diğer taraftan pK_{e2} değer-

leri 10.0-12.6 arasında değişmektedir. Liteartürde serinin -OH grubunun pK değerine raslanmamıştır. Bununla beraber, farklı yöntemlerle, PKE'nin aktivitesinden sorumlu bir serinin esteratik bölgede yer aldığı gösterildiğinden, bulunan pK_{e2} değerlerinin serinin -OH grubuna ait olduğu söylenebilir.

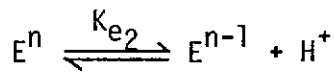
Ek bilgiler-I'de verilen mekanizmada E^{n+2} dissosiyeye olmamış enzim türünü oluşturmaktadır. Enzim, anyonik bölgedeki karboksil grubuna ait protonu ortama verdiğinde E^{n+1} oluşur. E^{n+1} , esteratik bölgedeki histidin ve serinin dissosiyeye olmadığı, protonlarını üzerlerinde taşıdığı enzim türüdür.



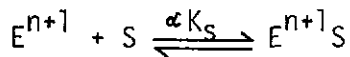
E^{n+1} dissosiyeye olarak E^n yi oluşturur :



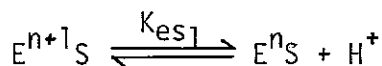
E^n , esteratik bölgedeki serinin dissosiyeye olmadığı enzim türüdür, protonunu ortama verdiğinde, E^{n-1} oluşur :



Diğer taraftan, bütiriltiyokolinde olduğu gibi, sübstrat pozitif yüklü ise E^{n+1} 'deki $-COO^-$ grubu ile kolinin kuarterner amonyum grubu iyonik bağ oluştururlar ve $E^{n+1}S$ kompleksi oluşur :



$E^{n+1}S$ kompleksinde, histidinin imidazol halkasındaki proton ortama verildiğinde, ürün oluşumuna yol açan E^nS kompleksi oluşur :



Bu tepkimede $K_{es_1} = \alpha K_{e_1}$ 'dir. Eşitlikten 25°C için $\alpha = 7.08$, 30°C için, $\alpha = 10$; 37°C için $\alpha = 6.3$ olarak hesaplanmıştır. Görüldüğü gibi pozitif yüklü bir sübstratın glutamik asidin $-\text{COO}^-$ grubuna bağlanması, esteratik bölgedeki histidinin daha kolay dissosiyeye olmasını sağlamaktadır.

Bununla beraber, fizyolojik pH'da glutamik asidin karboksil grubu tamamen dissosiyeye halde bulunduğundan hız eşitliğinin türetilmesinde, bu grupla ilgili hızlı-denge kullanılmamaktadır.

Çalışmanın yapıldığı deney şartlarında enzimde sıcaklığa bağlı bir konformasyon değişikliğinin olup olmadığını araştırmak için Arrhenius grafiği çizildi (Şekil-12). Grafiğin lineer olması 25°C ile 37°C arasında enzimin konformasyonunda sıcaklık etkisiyle bir değişiklik olmadığını göstermektedir.

Elde edilen bulgu, böyle bir değişikliğin 21°C 'da olduğunu gösteren ve sübstrat olarak o-nitrofenilbütiratın kullanıldığı çalışmalarla uyum sağlamaktadır (32,33).

Inhibisyon deneylerinde, lokal anestetik olarak kullanılan ve hidrofobik fenil gruplarını yapısında taşıyan iki bileşik, mepivakain ve sitanest, kullanıldı. Daha önce yapılan çalışmalarda, bazı lokal anestetiklerin PKE'yi inhibe ettiği gösterilmiştir. Fakat, bu konuda yapılan etraflı kinetik bir çalışma bulunmamaktadır.

Mepivakain içermeyen ve 0.15, 0.3, 0.6 mM mepivakain içeren deney ortamları kullanılarak elde edilen v 'ler (BTK) değerlerine karşı grafiklendiğinde, gerek kontrol eğrisinin, gerekse inhibitörlü eğrilerin Michaelis-Menten kinetiğine uymadığı ve takriben 2 mM BTK konsantrasyonu üzerinde, sübstrat aktivasyonunun olduğu gözlemlendi (Şekil-13).

Elde edilen hızlardan yararlanılarak, Lineweaver-Burk doğruları çizildiğinde, doğruların $1/(S)$ -ekseninin üst tarafındaki bir noktada keşiştiği saptandı ve mepivakain inhibisyonunun karışık-tipte bir inhibisyon olduğuna karar verildi.

Karışık-tipteki inhibisyonun lineer ya da hiperbolik tipte olduğunu anlayabilmek için, $1/v$ -ekseni kesim noktalarına karşı mepivakain konsantrasyonları; eğimlere karşı mepivakain konsantrasyonları grafiklendi (Şekil-16A ve Şekil-17A). Elde edilen eğrilerin hiperbolik olmasından, inhibisyon tipinin hiperbolik karışık-tip olduğuna karar verildi.

Genel inhibisyon mekanizmasında (Bkz. Ek bilgiler-II) yer alan α , β ve K_i sabitleri hız eşitliğinden yararlanılarak çizilen grafiklerden (Şekil-16B ve Şekil-17B) hesaplandı ve $\alpha = 1.96$, $\beta = 0.6$, $K_i = 0.034$ mM olarak bulundu.

Aynı deneyler 0.2, 0.6, 2.0 ve 6.0 mM sitanest kullanılarak yapıldığında, sitanest inhibisyonunun da hiperbolik karışık-tipte olduğu gözlemlendi ve $\alpha = 5$, $\beta = 0.13$ ve $K_i = 0.06$ mM olarak hesaplandı.

Mepivakain ve sitanest için α değerleri birden büyük, β 'lar ise sıfırla bir arasında olduğundan, her iki inhibitörün neden olduğu inhibisyonun "eğim-hiperbolik, kesim noktası-hiperbolik nonkompetitif inhibisyon" olduğuna karar verildi (40). Bu tip inhibisyon, kısmi kompetitif ve kısmi nonkompetitif inhibisyonun karışımıdır.

Muhtemelen, enzim aktif merkezinde kimotripsin için gösterildiği gibi (47), hidrofobik bir bölge bulunmaktadır. Ancak bu taktirde, mepivakain ve sitanest, bu bölge için BTK'nın hidrofobik bütiril grubu ile kompetisyona girerek, tepkimeyi kompetitif olarak inhibe edebilirler.

Hızlara karşı (BTK) değerleri grafiklendiğinde (Şekil-13), inhibitörsüz ya da inhibitörlü eğrilerin Michaelis-Menten kinetiğine uymadığı, inhibitör konsantrasyonunun artmasıyla, eğrilerin sigmoidal bir görünüm kazandığı görülmektedir. Bu nedenle inhibitörlerin, aktif merkez dışında ayrıca allosterik bir merkeze bağlanarak, enzimin konformasyonunu değiştirdikleri ve tepkimeyi nonkompetitif olarak inhibe ettikleri düşünülebilir.

Mepivakain için hesaplanan K_i değerinin, sitaneste nazaran daha küçük olması, mepivakainin yapısının hidrofobik bölgeye ya da aktif merkez dışındaki allosterik merkeze daha uygun olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak, sunulan çalışma ile PKE'nin sübstratına karşı negatif kooperativite gösteren bir enzim olduğu; aktivitesinden aktif merkezinde yer alan bir histidin ve bir serinin sorumlu olduğu ve muhtemelen aktif merkezinde, aynı zamanda aktif merkezin dışında, hidrofobik grupların bağlanabileceği bölgelere sahip olduğu anlaşılmıştır.

Ö Z E T

Çalışmada, insan serum psödokolinesterazının (asilkolin asilhidrolaz E.C. 3.1.1.8) kinetik özellikleri araştırıldı ve sübstratına karşı negatif kooperativite gösterdiği bulundu.

Enzimin V_m , K_S , n_H gibi kinetik sabitleri, iki ayrı tampon (pH= 7.5) içinde hazırlanan deney karışımlarında, 37°C'da ölçülen hızlardan yararlanılarak çizilen Lineweaver-Burk doğrularından ve Hill grafiğinden hesaplandı. Potasyum fosfat tamponu (KPO_4) kullanıldığında $V_m = 71.4 \mu\text{mol/dak/mg}$, $K_S = 0.18 \text{ mM}$, $n_H = 0.8$; MOPS kullanıldığında ise $V_m = 58.8 \mu\text{mol/dak/mg}$, $K_S = 0.18 \text{ mM}$, $n_H = 1.1$ olarak bulundu.

Yapılan pH ve temperatur çalışmalarında hızlar 25°C, 30°C ve 37°C da pH = 5 ile pH = 10.3 arasında ölçüldü. V_m gör.'e karşı pH ve V_m gör./ K_S gör.'e karşı pH grafikleri çizilerek, enzim-sübstrat kompleksinin ve aktiviteden sorumlu prototropik grupların pK değerleri saptandı. pK_{ES_1} 'ler, 25°C için 6.55, 30°C için 6.5, 37°C için 6.6; pK_{E_1} 'ler aynı sıcaklıklarda sırasıyla 7.6, 7.5, 7.4 ve pK_{E_2} 'ler 10.0, 10.1, 12.6 olarak hesaplandı. Elde edilen bulgulardan, prototropik gruplardan birinin aktif merkezde yer alan histidine, diğerinin ise serine ait olduğu sonucuna varıldı.

Çizilen Arrhenius grafiğinin 25°C ile 37°C arasında lineer olması nedeniyle, enzimin konformasyonunda sıcaklık etkisiyle bir değişiklik olmadığı saptandı ve doğrunun eğiminden $E_a = 10.2 \text{ Kkal/mol}$ olarak hesaplandı.

Lokal anesteziye kullanılan mepivakain ve sitanestle yapılan inhibisyon deneyleri sonunda, mepivakain için $\alpha = 1.96$, $\beta = 0.6$, $K_i = 0.034 \text{ mM}$ ve sitanest için ise $\alpha = 5$, $\beta = 0.13$, $K_i = 0.06 \text{ mM}$ olarak bulundu ve her iki inhibitör için inhibisyonun "eğim-hiperbolik, kesim noktası-hiperbolik nonkompetitif inhibisyon" olduğuna karar verildi.

K A Y N A K L A R

1. McQueen, J., Plaut, D., A review of clinical applications and methods for cholinesterase. *Am. J. Med. Techn.*, 39, 279-285, 1973.
2. Wetherell, J.R., French, M.C., The hydrolysis of succinylthiocholine and related thiocholine esters by human plasma and purified cholinesterase. *Biochem. Pharmacol.*, 35, 939-945, 1986.
3. Kambam, J.R., Naukam, R.J., Sastry, B.V., The effect of procainamide on plasma cholinesterase activity. *Can. J. Anaesth.*, 34, 579-581, 1987.
4. Perez-Guillermo, F., Delgado, E.M., Vidal, C.J., Inhibition of human serum and rabbit muscle cholinesterase by local anesthetics. *Biochem. Pharmacol.*, 36, 3593-3596, 1987.
5. Brown, S.S., Kalow, W., Pilz, W., Whittaker, M., Woronick, C.L., The plasma cholinesterases : A new perspective. *Adv. Clin. Chem.*, 22, 1-123, 1981.
6. Karahasanoğlu, A.M., Özand, P.T., Pseudocholinesterases II. Two cases of pseudocholinesterase deficiency. *Turkish J. Pediat.*, 8, 10-19, 1966.
7. Swift, M.R., LaDu, B.N., A rapid screening test for atypical serum-cholinesterase. *Lancet*, 1, 513-514, 1966.

8. Abernethy, M.H., George, P.M., Herron, J.L., Evans, R.T., Plasma cholinesterase phenotyping with use of visible region spectrophotometry. *Clin. Chem.*, 32, 194-197, 1986.
9. Nagy, I., Sashegyi, J., Kurcz, M., Baranyai, P., Separation of serum cholinesterase isozymes by polyacrylamide gradient gel electrophoresis. *Acta Biochim. et Biophys. Acad. Sci. Hung.*, 9, 209-212, 1974.
10. Chemnitius, J.M., Haselmeyer, K.H., Zech, R., Identification of isoenzymes in cholinesterase preparations using kinetic data of organophosphate inhibition. *Anal. Biochem.*, 125, 442-452, 1982.
11. Yamamata, K., Marito, F., Setoguchi, Y., Fujii, S., Kariya, T., Sakai, T., Characterization of serum cholinesterase in familial hypercholinesterasemia associated with an isozyme variant band. *Gastroenterol. Jpn.*, 22, 187-193, 1987.
12. Duncan, R.C., Griffith, J., Konefal, J., Comparison of plasma cholinesterase depression among workers occupationally exposed to organophosphorus pesticides as reported by various studies. *J. Toxicol. Environ. Health.*, 18, 1-11, 1986.
13. Surgenor, D.M., Ellis, D., Preparation and properties of serum and plasma proteins, plasma cholinesterase. *J. Am. Chem. Soc.*, 76, 6049-6052, 1954.
14. Renda, N., Tezcan, E.F., Mergen, K., İnsan serum psödokolinesterazının saflaştırılması. *Doğa*, 2, 34-37, 1978.

15. Axen, R., Heilbronn, E., Winter, A., Preparation and properties of cholinesterase covalently bound to Sepharose. *Biochim. Biophys. Acta*, 191, 478-481, 1969.
16. Ralston, J.S., Main, A.R., Kilpatrick, B.F., Chasson, A.L., Use of procainamide gels in the purification of human and horse serum cholinesterases. *Biochem. J.*, 211, 243-250, 1983.
17. Boutin, D., Brodeur, J., Human serum cholinesterases : Molecular weight estimation of a subunit structure. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 49, 777-779, 1971.
18. Muensch, H., Goedde, H.W., Yoshida, A., Human serum cholinesterase subunit and number of active sites of the major component. *Eur. J. Biochem.*, 70, 217-223, 1976.
19. Tezcan, E.F., İnsan serum psödokolinesterazının sedimentasyon ve diffüzyon çalışmaları. *Biyokimya Dergisi*, 2, 22-32, 1977.
20. Tezcan, E.F., İnsan serum psödokolinesterazının alt birim yapısı. *Biyokimya Dergisi*, 1, 97-107, 1977.
21. Lookridge, O., Eckerson, H.W., LaDu, B.N., Interchain disulfide bands and subunit organization in human serum cholinesterase. *J. Biol. Chem.*, 254, 8324-8330, 1979.
22. Lockridge, O., Adkins, S., LaDu, B.N., Location of disulfide bands within the sequence of human serum cholinesterase. *J. Biol. Chem.*, 262, 12945-12952, 1987.

23. Lockridge, O., LaDu, B.N., Comparison of atypical and usual human serum cholinesterase : Purification, number of active sites, substrate affinity, and turnover number. *J. Biol. Chem.*, 253, 361-366, 1978.
24. Wilson, I.B., Bergmann, F., Studies on cholinesterase. VII. The active surface of acetylcholinesterase derived from effects of pH on inhibitors. *J. Biol. Chem.*, 185, 479-489, 1950.
25. Lockridge, O., LaDu, B.N., Amino acid sequence of the active site of human serum cholinesterase from usual, atypical and atypical-silent genotypes. *Biochem. Gen.*, 24, 485-498, 1986.
26. Lockridge, O., Bartels, C.F., Vaughan, T.A., Wong, C.K., Norton, S.E., Johnson, L.L., Complete amino acid sequence of human serum cholinesterase. *J. Biol. Chem.*, 262, 549-557, 1987.
27. McTiernan, C., Adkins, S., Chatonnet, A., Vaughan, T.A., Bartels, C.F., Kott, M., Rosenberry, T.L., LaDu, B.N., Lockridge, O., Brain cDNA clone for human cholinesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 84, 6682-6686, 1987.
28. LaDu, B.N., Lockridge, O., Molecular biology of human serum cholinesterase. *Fed. Proc.*, 45, 2965-2969, 1986.
29. Tezcan, E.F., Psödokolinesterazın allosterik kinetik özellikleri, Ph.D. Tezi, 1969, Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Ankara.
30. Tezcan, E.F., Çeşitli anyonların serum kolinesterazına (psödokolinesteraz) etkisi. *Biyokimya Dergisi*, 1, 29-40, 1976.

31. King, J., Morgan, H.G., The temperature activity relationships of serum cholinesterases. *J. Clin. Pathol.*, 23, 730-732, 1970.
32. Masson, P., Balny, C., Thermodynamic arguments for temperature-induced cryptic conformational change of human plasma cholinesterase. *Biochim. Biophys. Acta*, 874, 90-98, 1986.
33. Ferro, A., Masson, P., Kinetic evidence for thermally induced conformational change of butyrylcholinesterase. *Biochim. Biophys. Acta*, 916, 193-199, 1987.
34. Catalan, R.E., Hernandez, F., Temperature effects on cholinesterases from rat brain capillaries. *Bioscience Reports*, 6, 573-577, 1986.
35. Ellman, G.C., Courtney, K.P., Andres, V., Jr., Featherstone, R.M., A new rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, 7, 88-95, 1961.
36. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., Protein measurements with Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275, 1951.
37. Sümbüloğlu, K., Sağlık bilimlerinde araştırma teknikleri ve istatistik. Ankara, Matis Yayınları, 1978, s. 191-196.
38. Segel, I.R., *Enzyme Kinetics*. Toronto, John Wiley and Sons Inc, 1975, s. 377-382.
39. Ibid : Kaynak 38, s. 884-941.
40. Ibid : Kaynak 38, s. 183-188.

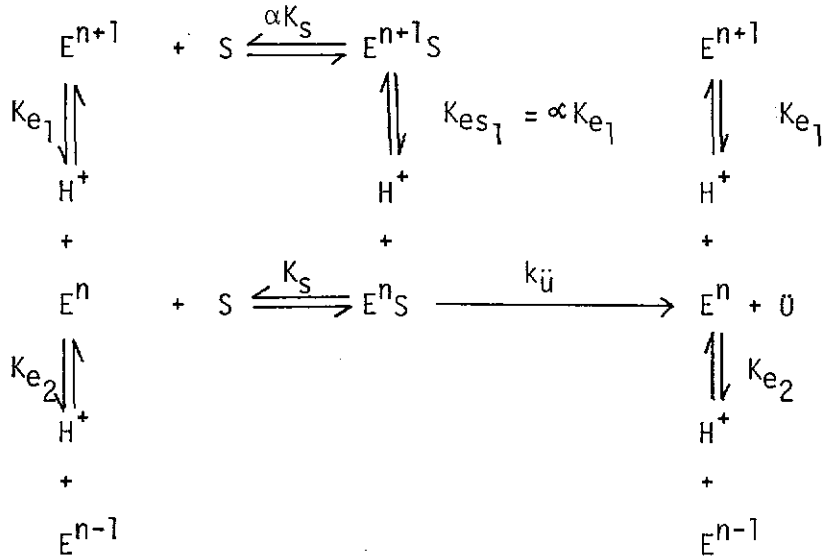
41. Monod, J., Wyman, J., Changeux, J.P., On the nature of allosteric transitions : A plausible model. *J. Mol. Biol.*, 12, 88-118, 1965.
42. Eckerson, H.W., LaDu, B.N., A mathematical model for evaluating the reaction of paraoxon with human serum cholinesterase and with polymorphic forms of paraoxonase. *Drug Methabolism and Disposition*, 12, 57-62, 1984.
43. Bedford, C.D., Miura, M., Bottaro, J.C., Howd, R.A., Nolen, H.W., Nonquaternary cholinesterase reactivators. IV. Dialkylaminoalkyl thioesters of alpha-keto thiohydroxamic acids as reactivators of ethylmethylphosphonyl- and 1,2,2-trimethylpropyl methylphosphonyl-acetylcholinesterase in vitro. *J. Med. Chem.*, 29, 1689-1696, 1986.
44. Lockridge, O., LaDu, B.N., Loss of the interchain disulfide peptide and dissociation of the tetramer following limited proteolysis of native human serum cholinesterase. *J. Biol. Chem.*, 257, 12012-12018, 1982.
45. Atack, J.R., Perry, E.K., Bonham, J.R., Perry, R.H., Molecular forms of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in human plasma and cerebrospinal fluid. *J. Neurochem.*, 48, 1845-1850, 1987.
46. Pavlic, M.R., Dissociation constants of the esteratic centre of butyrylcholinesterase. *Biochim. Biophys. Acta*, 284, 435-440, 1972.
47. Lehninger, A.L., *Principles of Biochemistry*. New York, Worth Publishers Inc, 1982, s. 230-231.

E K B İ L G İ L E R - I (39) :

Enzimatik Aktiviteden Sorumlu Prototropik Grupların Saptanması :

Tepkime mekanizması aşağıda verilmiştir.

E^{n+1} , E^{n+2} 'nin dissosiasyonu ile oluşur.



Hız eşitliği :

$$\frac{v}{V_m} = \frac{(S)}{K_s} \frac{1}{1 + \frac{(H^+)}{Ke_1} + \frac{Ke_2}{(H^+)} + \frac{(S)}{K_s} + \frac{(S)(H^+)}{K_s K_{es1}}}$$

ya da :

$$\frac{v}{V_m} = \frac{(S)}{K_s \left(1 + \frac{(H^+)}{Ke_1} + \frac{Ke_2}{(H^+)}\right) + (S) \left(1 + \frac{(H^+)}{K_{es1}}\right)}$$

$$\frac{1}{v} = \left(1 + \frac{(H^+)}{Ke_1} + \frac{Ke_2}{(H^+)}\right) \frac{K_s}{V_m} \frac{1}{(S)} + \frac{1}{V_m} \left(1 + \frac{(H^+)}{K_{es1}}\right)$$

Son eşitlik yardımıyla V_m gör. ve K_s gör.'ler bulunabilir.

V_m gör. değerleri pH'a karşı grafiklendiğinde, pH'nın artmasıyla V_m gör. değerlerinin arttığı ve bir V_m değerinde limite ulaştığı gözlenir. $V_m/2$ 'ye karşı gelen pH, pK_{e1} 'e eşittir.

V_m gör./ K_s gör.'ler pH'ya karşı grafiklendiğinde, pH'nın artmasıyla V_m gör./ K_s gör. değerlerinin arttığı ve bir maksimumdan geçtiği gözlenir.

Maksimum noktasında, V_m gör./ K_s gör. değeri V_m/K_s değerine ulaşır. Bu noktaya karşı gelen pH aşağıdaki eşitlikle verilebilir.

$$pH_{opt.} = \frac{pK_{e1} + pK_{e2}}{2}$$

V_m gör. / 2 K_s gör. değerine karşı gelen pH ise pK_{e1} 'e eşittir.

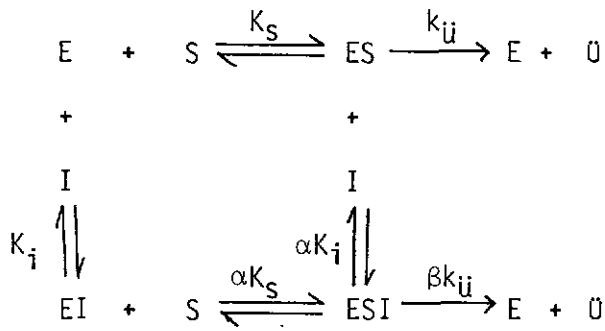
Not 1- V_m gör., V_m görünen (V_m apparent)'in kısaltılmış şeklidir.

2- K_s gör., K_s görünen (K_s apparent)'in kısaltılmış şeklidir.

E K B İ L G İ L E R - I I (40) :

Hiperbolik Karışık-Tip (mixed-typed) İnhibisyon ($1 < \alpha < \infty$, $0 < \beta < 1$, Eğim - Hiperbolik, Kesim Noktası - Hiperbolik, Nonkompetitif İnhibisyon) :

Bu tip inhibisyon, kısmi kompetitif ve kısmi nonkompetitif inhibisyonun karışımıdır. Dengeler aşağıdaki gibi verilebilir :



Yukardaki modele göre S, E ve EI'ye farklı afinitelerde olmak üzere bağlanır. ES ve ESI farklı hızlarda olmak üzere ürün oluşturur.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_S}{V_m} \left(1 + \frac{(I)(\alpha - \beta)}{\beta(I) + \alpha K_i} \right) \frac{1}{(S)} + \frac{1}{V_m} \left(1 + \frac{(I)(1 - \beta)}{\beta(I) + \alpha K_i} \right)$$

İnhibitörsüz doğru (kontrol doğrusu) ve inhibitörlü doğrular $1/(S)$ -eksenin üst tarafında bir noktada kesişirler.

Verilen inhibisyon sisteminde, eğimlere ya da $1/v$ -ekseni kesim noktalarına karşı inhibitör konsantrasyonları (I), grafiklendiğinde hiperbolik eğriler elde edilir. Bu nedenle α , β ve K_i değerleri, aşağıdaki eşitliklere göre, $1/\Delta$ kesim noktalarına karşı ya da $1/\Delta$ eğimlere karşı $1/(I)$ 'lerin grafiklenmesiyle elde edilen doğrular yardımıyla bulunur.

$$\frac{1}{\Delta \text{ kesim noktası}} = \frac{\alpha K_i V_m}{(1 - \beta)} \frac{1}{(I)} + \frac{\beta V_m}{(1 - \beta)}$$

$$\frac{1}{\Delta \text{ eğim}} = \frac{\alpha K_i V_m}{K_S (\alpha - \beta)} \frac{1}{(I)} + \frac{\beta V_m}{K_S (\alpha - \beta)}$$