

## SAFLAŞTIRILMIŞ İNSAN SPERM AKROZİNİNİN KİNETİK ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Vedat AKIN (x)  
Dr. Necati KAYA (xx)

### ÖZET :

*İnsan spermlerinden saflaştırılmış akrozinin kinetik özellikleri (Enzim-substrat ilişkisi ve pH'nin etkisi) araştırıldı. Substrat konsantrasyonunun (BAEE), aktiviteye etkisi Lineweaver-Burk grafiği ile incelendi. Grafikten Km:  $4 \times 10^{-5}$  M ve Vmax: 30.0  $\mu$ M bulundu. PH 5.5 ilâ 10.5 arasında aktivite ölçümleri yapıldı. Enzim pH 8.0 de maksimum aktivite gösterdi.*

### GİRİŞ VE AMAÇ

Akrozin (EC 3.4.21.10) intrasellüler ve ekstrasellüler fonksiyonun önemli katalitik regülatörleri olan serin proteinazlar sınıfındandır (1). Akrozin bu grup içinde, üreme fonksiyonlarında görev yapan enzimdir. Uzun zamandan beri sperm yumurtaya penetrasyonunun akrozomal enzimlere bağlı olduğu kabul edilmektedir(2). Akrozinin testis epididim ve ejaküel spermelerinde bir zimojen şeklinin bulunması proakrozin-akrozin sistemini ilginç hale getirmiştir (3). Bu sebeple akrozin üzerine bir çok araştırma yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda insan akrozinin iç akrozom membranına, proakrozinin ise membrana bağlı olduğu ortaya çıkmıştır (4,5,6). Akrozin türlere özgü bir enzim olduğu için; amino asit asit bileşimleri, moleküler ağırlıkları ve bir çok özelliği türden türe değişir (7,8).

Akrozomal bir proteinaz olan akrozinin ovumunzona pellucidasını sindirerek fertilizasyona yardımcı olduğu bilinmektedir. (9,10). Ülkemizde infertilite vak'alarının az olmadığı gözönüne alındığından, çalışmalarımızda bu enzimin iyice tanınmasını ve böylece klinik incelemelere ışık tutmasını hedefledik.

(x) Uz. Dr. Numune Hastanesi Biyokimya Lab. Sorumlusu ERZURUM

(xx) Yrd. Doç. Dr. A.Ü. Kars Vet. Fak. Dekan Yardımcısı

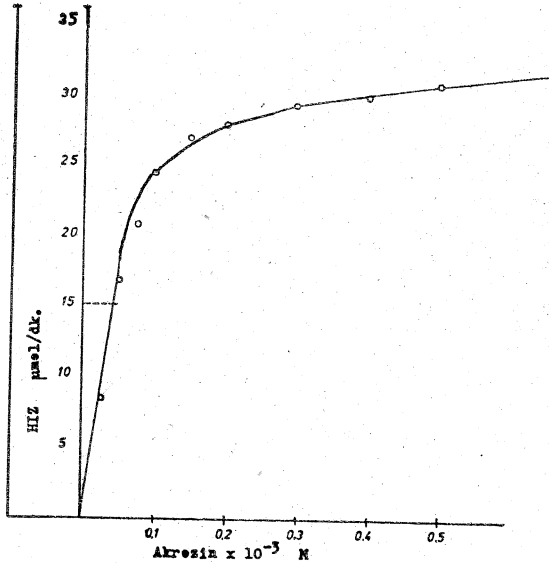
## MATERYAL VE METOD

Substrat olarak N $\alpha$ -benzoil-L-arginin etil ester (BAEE) kullanıldı. 0.25, 0.50, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mM konsantrasyonlarında substrat kullanılarak ve enzim miktarı değiştirilmeden enzim-substrat ilişkisi incelendi. Sonuçlar Michealis-Mentan ve Lineweaver Burk eğrileri ile gösterildi.

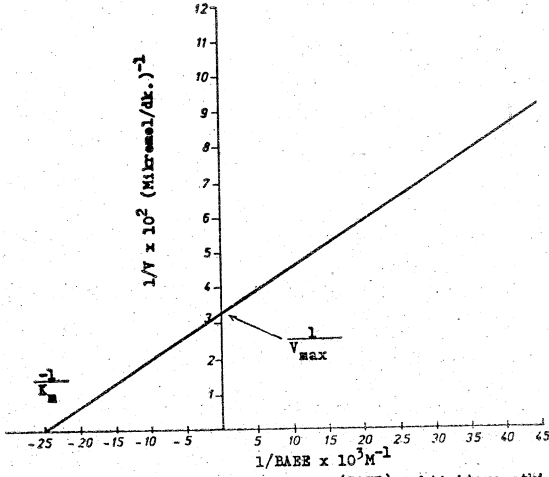
Enzim aktivitesine pH'nın etkisini tesbit etmek için, çeşitli pH larda bir seri tampon ozelti (sitrat tamponu pH 5.5, fosfat tamponu pH 7.0, fosfat tamponu pH 7.4, tris tampon pH 8.0, glisin tamponu pH 10, glisin tamponu pH 10.5) hazırlandı. Bu farklı pH lardaki tamponlar ile enzim 5 dak. inkübe edildikten sonra BAEE'i hidrolizetme hızı ve aktivitesi lld. Enzim aktivitesi Schwert ve Takenake'ye göre yapıldı (11,12).

## BULGULAR

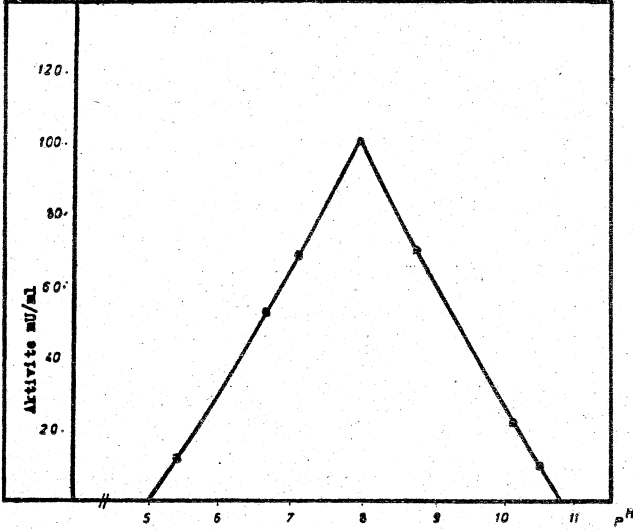
Enzimin substratı olan BAEE konsantrasyonuna bağlı olarak ativitesindeki değişiklik lld. Elde edilen bulgularla çizilen Michealis-Mentan ve Lineweaver-Burk eğrileri Grafik-1 ve Grafik-2'de gösterilmiştir. Grafik-2'den de grleceği üzere, Km :  $4 \times 10^{-5}$  ve Vmax: 30.0  $\mu$ M bulundu. PH 5.5 ilâ 10.5 arasında yapılan aktivite lmleri Grafik-3'de gösterilmiştir. Enzimin pH 8.0 de maksimum aktivite verdiği gözlendi.



Grafik 1. Substrat (BAEE) Konsantrasyonuna Akresin Aktivitesine Etkisi. (Michealis-Mentan) Eęrisi



Grafik 2. Substrat Konsantrasyonunun (BAEE), aktiviteye etkisinin Lineweaver-Burke Grafiği ile incelenmesi. Grafikten  $K_m : 4 \times 10^{-5}$  M ve  $V_{max} : 30.0 \mu\text{M}$  Bulundu.



Grafik 3. Alkalin Fosfataz Aktivitesinin pH na Etkisi.

## TARTIŞMA

Artan substrat konsantrasyonlarında enzim ativitesi Michealis-Mentan ve Lineweaver Burk kinetik eğrilerine uygulandı. Bu grafiklerden  $K_m$ :  $4 \times 10^{-5}$  M ve  $V_{max}$ :  $30.0 \mu\text{M/dak}$ . olarak bulundu. Bu konuda literatürde sadece bir kaç ça-

İşmada bu değerler verilmiştir. Domuz akrozini için Polakoski ve Mc Rorie Km i  $4.8 \times 10^{-5}$  M ve Vmax 'i  $3.1 \mu\text{M}/\text{dak}/\text{U}$  olarak vermişlerdir (12). İnsan akrozini için Anderson ve arkadaşları (13) Km 'i  $3.6 \times 10^{-5}$  M olarak bulmuşlardır. Bizim bulgularımız her iki çalışmanın sonuçları ile uyum içindedir. Stambough ve Bucklen saflaştırılmış tavşan sperm ekstraktlarında Km:  $5.2 \times 10^{-6}$  M bulmuşlardır(12). Bu sonuç bizim bulduğumuz değerden daha küçük bir değerdir.

Akrozin aktivitesine pH nın etkisini araştırmak için, çeşitli pH larda enzim 5 dak. inkübe edildikten sonra akrozin aktiviteleri ölçüldü. Enzim aktivitesi düşük pH larda daha kararlı olmasına rağmen (14,15,16). optimal pH 8.0 olarak bulunmuştur. Bu pH da enzim %100 aktivite göstermektedir. Bazı araştırmacılar pH 1 8.2-8.5 arasında bulluşturlar (14,17). Fakat, yayınların çoğu optimal pH yı 8.0 olarak vermektedir (16,18,19). Bizim bulgularımız literatür bulguları ile uyum göstermektedir. pH 6.0 nın altında ve 10.0 un üstünde aktivitesini çok kaybettiği için nötral proteinazlar grubuna sokulabilir (18).

#### *SUMMARY :*

#### *THE STUDY ON THE KINETIC PROPERTIES OF ACROSIN PURIFIED FROM HUMAN SPERMATOOA*

The kinctic properties (relation of enzyme-substrate and the effect of pH) of acrosin purified from human spermatozoa have been investigated. The efect of substrate concentration on activity have been determined by Lineweaver-Burk equation. Km and Vmax were respectively  $4 \times 10^{-5}$  M and  $30.0 \mu\text{M}$ . Activity measurements between pH 5.5-10.5 were made. Maximum activity observed at pH 8.0.

#### **KAYNAKLAR**

1. Scheiner, C., Quigley, J.P.: Detection, identification, and partial characterization of serine protease and esterasesin biological systems. Anal. Biochem. 122: 58-69, 1982.
2. Van Blerkom, J., Motta, P.: The cellular basis of mammalian reproduction, Urban and Schwarzerberg, 135-163, 1979.
3. Mukorji, S.K.: Studies on the rabbit proacrosin-acrosin system. Arch Biochem. Biophys. 230: 412-423, 1984.
4. Berrut, G., Martegani, E.: Dansylalanlylschloromethyl ketone as a fluorescent probe for localization of acrosin activity in boar and human spermatozoa. J. Histochem. Cytochem. 32: 526-530, 1984.
5. Berrut, G., Martegani, E.: Cytochemical demonstration that acrosin is unavailable in intact ejaculated boar and bull spermatozoa. J. Exp. Zool. 222: 149-154, 1982.

6. Stambaugh, R., Buckley, J.: Histochemical subcellular localization of the acrosomal proteinase effecting dissolution of the zona pellucida using fluorescein-labelled inhibitors. *Fertil Steril.* 23: 348-352, 1972.
7. Gaddum, P., Blandau, R.J.: Proteolytic reaction of mammalian spermatozoa on gelatin membranes. *Science.* 170: 749-751, 1970.
8. Fridberger, A., Klint, M., Sundelin, J., Peterson, A.: The amino terminal sequences of boar sperm proacrosin and active acrosin are identical. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 121: 884-889, 1984.
9. Stambaugh, R., Smith, M.: Amino acid content of rabbit acrosomal proteinase and its similarity to human trypsin. *Science.* 186: 745-746, 1974.
10. Berruti, G.: Evidence of high molecular weight form of acrosin boar acrosomal extract. *Int. J. Biochem.* 17: 87-94, 1985.
11. Johnson, L.E., Pursel, V.G., Chaney, K.M., Garner, D.L.: Comparison of several extraction procedures for boar spermatozoa acrosin. *Biol. Reprod.* 15: 79-83, 1976.
12. Polakoski, K.L., Mc. Rorie, A.: Boar acrosin-II. classification, inhibition and specificity studies of a proteinase from sperm acrosomes. *J. Biol. Chem.* 248: 8183-8188, 1973.
13. Anderson, R.A., Beyler, S.A., Mack, S.R., Zaneveld, L.J.D.: Characterization of a high-molecular-weight form of human acrosin. *Biochem. J.* 199: 307-316, 1981.
14. Zaneveld, L.J.D., Polakoski, K.L., Williams, W.L.: Properties of a proteolytic enzyme from rabbit sperm acrosomes. *Biol. Reprod.* 6:30-39. 1972.
15. Polakoski, K.L., Parrish, R.F.: Boar proacrosin: Purification and preliminary activation studies of proacrosin isolated from ejaculated boar sperm. *J. Biol. Chem.* 252: 1888-1894, 1977.
16. Zaneveld, L.J.D., Schumacher, G.F.B., Travis, J.: Human sperm acrosomal proteinase: antibody inhibition and immunological dissimilarity to human pancreatic trypsin. *Fertil. Steril.* 24: 479-484, 1973.
17. Straus, J.w., Parrish, R.F., Polakoski, K.L.: Boar acrosin: Association of an endogenous membrane proteinase with phospholipid membrane. *J. Biol. Chem.* 256: 5662-5668., 1981.
18. Syner, F.N., Moghissi, K.S.: Purification and properties of human seminal proteinase. *Biochem. J.* 126:1135-1140, 1972.
19. Mc. Rorie, R.A., Williams, W.L.: Biochemistry of mammalian fertilization. *Annu. Rev. Biochem.* 43: 777-803, 1974.