

İNSAN PLASENTASINDAN SAFLAŞTIRILAN LÖSİN AMİNOPEPTİ- DAZIN SAFLIĞININ VE ALT BİRİMLERİNİN POLİAKRİLAMİD JEL ELEKTROFOREZİ İLE ARAŞTIRILMASI

Dr. Necati KAYA (x)

Dr. Vedat AKIN (xx)

Dr. Y. Nuri ŞAHİN (xxx)

ÖZET

Lösın aminopeptidaz, hamilelik boyunca kan serumunda normalin çok üstünde aktivite göstermektedir. Çeşitli dokulardan saflaştırılan lösın aminopeptidazın özelliklerinin araştırılması ile enzimin kaynağına inilebilir. Bu amaçla önceden insan plasentasından modifiye bir metotla lösın aminopeptidazı saflaştırdık.

Plasental lösın aminopeptidaz'ın saflığının ve alt birimlerinin araştırılması ise, poliakrilamid jel elektroforezi ile yapıldı. Normal poliakrilamid jel elektroforezi ile enzim fraksiyonu tek bir band verdi. Sodyum dodesil sülfatlı poliakrilamidjel elektroforezi ile elde edilen bandın, diğer standart maddelerin bantlarıyla karşılaştırılması sonucunda da enzimin alt birim molekül ağırlığı 51.000 olarak bulundu.

GİRİŞ VE AMAÇ

Lösın aminopentidaz (LAP : EC 3.4.11.1), karaciğer, pankreas, böbrek ve ince bağırsakta yüksek aktiviteli olmak üzere, genellikle insan dokularının hepsinde bulunur (1,2,3,4). LAP'ın esas kaynağı pankreas hücreleridir ve burada proteolitik enzimler vasıtasıyla, sindirim süresince serbest kalan peptidlerin tam yıkımı için üretilir(5).

LAP çinko metalopeptidaz olup, molekül ağırlığı 320.000 dalton civarındadır (6,7,8,9). LAP'ın 6 adet altbirimi vardır ve her bir altbirimi 2 tane iki değerlikli metal katyonu (Zn^{++}) ihtiva eder (6,7,8,9). Bu yapı $LAPZn_6$ Zn_6 şeklinde gösterilebilir (6,8,9). Her altbirim bir tek polipeptid zincirinden ibaret olup, herbirinin

(x) A.Ü. Kars Vet. Fak. Biyokimya Bilim Dalı Yrd. Doç. Dr.

(xx) Biyokimya Uzmanı, serbest çalışıyor.

(xxx) A.Ü. Tıp Fak. Biyokimya Anabilim Dalı Doç. Dr.

molekül ağırlığı 54.000 dalton civarındadır (10), LAP'ın yapısında lösin, izolösin ve valin gibi amino asitler bol bulunmakla beraber, düşük muhteviyatta da olsa aromatik amino asitler mevcuttur (11).

Poliakrilamid jel elektroforezi (PAJE): proteinleri, molekül ağırlıklarına, elektriksel yüklerine ve molekül biçimlerine göre ayıran bir tekniktir(12). Bu yöntemle enzimlerin saflığı kontrol edilebildiği gibi molekül ağırlıkları ve altbirim sayısı ile onların molekül ağırlıklarını da saptayabilir. Jel, akrilamidin çapraz bağlayıcı olarak kullanılan, N, N-metilen-bis-akrilamid tarafından polimerize edilmesiyle hazırlanır. Bu reaksiyon fotokatalizör etkisi gösteren, riboflavin-N, N,N',N'-tetrametilen diamin (TEMED) veya amonyum persülfat-TEMED karışımları tarafından katalizlenir. Maddelerin (akrilamid ve bis) konsantrasyonları ve katalizörün cinsi ve pH, jelin gözenek büyüklüğünü etiler. pH ve yüzdesi düşük jel (pH 6.8 ve % 3 gibi) daha geniş gözenekli olur. pH'si ve yüzdesi yüksek jel ise daha sık gözeneklidir(12).

MATERYAL VE METOD

Jelin hazırlanışı Weber'e göre yapıldı (13,14). Önce % 10 luk akrilamid çözeltisi hazırlandı. Bunu için 22.2 gr akrilamid ve 0.6 gr metilenbisakrilamid 100 ml suda çözüldü. Bu çözelti süzülerek bundan 13.5 ml alındı, 15 ml jel tamponu (0,2M Na-Fosfat tamponu), ile karıştırıldı.

Bu karışıma 1.5 ml taze hazırlanmış amonyum persülfat (15 mg/ml) ve 0.045 ml TEMED katıldı. Bu son karışım, alt tarafları parafilm ile kapatılmış ve dik olarak yerleştirilmiş 0.6 x 10 cm boyunda cam kolonlara üst ten yaklaşık 0.5 cm boşluk kalıncaya kadar dolduruldu.

Normal Poliakrilamid Jel Elektroforezinin Yapılışı:

Normal PAJE enzimin saflığını kontrol için denendi. Uygulama Davies ve Shuster'in metodlarına göre yapıldı (15,16). 50 µl enzim çözeltisi 5 µl Brom fenol mavisi (öncül boya), 1 damla gliserin ve 50 µl tampon, vortex ile karıştırıldı. Bu karışımdan 50 µl kolonların üst ucuna tatbik edildi ve üzeri elektroforez yapılacak tampon (Fosfat tamponu pH 7.0) ile dolduruldu. Tüp başına önce 5 mA ve numune jele geçtikten sonra 8 mA güç tatbik edildi. Öncül boya jel çıkışına 3 cm kalıncaya kadar yürütüldü. Sonra jel kolondan çıkarılarak, 1,25 gr coomassie brillant blue+ 545 ml % 50 metanol+ 46 ml glisial asetik asid ihtiva eden boya çözeltisi içinde 2 saat bekletildi. Boyama süresi sonunda boya, asetik asid/metanol/su (70/50/875) çözeltisi ile tamamen çıkıncaya kadar yıkandı. Bu jeller kapaklı tüplerde boya çıkarıcı çözelti içinde oda sıcaklığında bekletildi.

Sodyum Dodesil Sülfatlı (SDS) Poliakrilamid Jel Elektrofrezinin Yapılışı:

Standart olarak monomer yapıda olan ya da at birim molekül ağırlıkları bilinen bovine albumin (67.500), α -amilaz (45.000), pepsin (35.000) ve ürikaz (100.000) standart protein olarak kullanıldı.

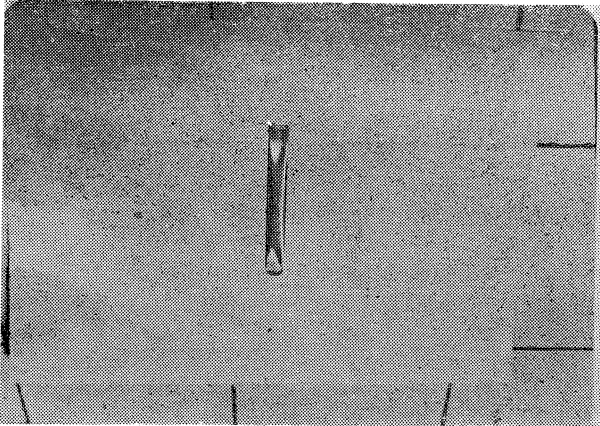
Numuneler % 1 SDS ve % 1 2- merkaptotanol ile 2 dakika kaynar su banyosunda tutularak denatüre edildi. Sonra numune ve standart proteinlerden 0.2 ml. 1 damla gliserol, 10 μ l öncül boya karıştırılarak daha önce anlatıldığı şekilde kolonlara tatbik edildi. Öncül boya çıkışa 3 cm kalıncaya kadar yürütüldü. Sonra kolondan çıkarılan jeller 2 saat coomassie brillant blue ile boyandı. Boyayı çıkarmak için % 10'luk asetik asit ile 4-6 saatte bir değiştirmek suretiyle muamele edildi.

Her kolondaki protein standartlarının ve numunelerin hareketlilikleri aşağıdaki formülden hesaplandı.

$$\text{Hareketlilik} = \frac{\text{Protein bandının aldığı mesafe}}{\text{Boyadan sonra jel boyu}} \times \frac{\text{Boyadan önceki jel boyu}}{\text{Öncül boyanın aldığı mesafe}}$$

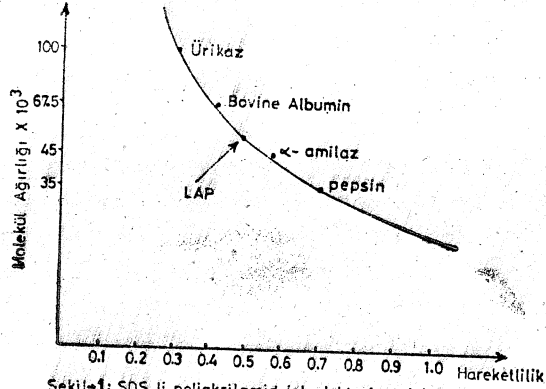
BULGULAR

Enzim preparatı normal poliakrilamid jel elektrofrezinde bir protein bandı verdi. Elde edilen tek band, enzimin saflaşmış olduğunu gösterdi (Resim-1)



Resim-1. Poliakrilamid Jel Elektrofrez Bandı

Enzim preparatı, SDS'lı poliakrilamid jel elektrofrezine tabi tutuldu. Elde edilen banttı hesaplanan hareketlilik molekül ağırlıklarına karşı grafiklendi. Bu şekilde enzimin alt birim molekül ağırlığı 51.000 olarak bulundu (Şekil-1).



Şekil-1: SDS li poliakrilamid jel elektroforezi ile alt birim molekül ağırlığının standart eğriden bulunması.

TARTIŞMA

Enzim çözeltisi ile yaptığımız normal poliakrilamid jel elektroforezi sonucu tek bant görülmesi saflığın bir işareti sayıldı. Enzimin alt birim molekül ağırlığı SDS'lı poliakrilamid jel elektroforezi ile 51.000 bulundu (Şekil-1). Enzimin 6 alt birimi olduğu bilindiğinden molekül ağırlığı 306.000 olarak hesaplandı. Bu sonuçlarımız literatürle uygunluk içindedir. Himmelhoch, domuz böbreğinden saflaştırdığı LAP'ın molekül ağırlığını Sefadeks G-200 kromatografisi ile 300.000 bulmuştur (8). Kohno, insan karaciğerinden elde ettiği enzimin molekül ağırlığını sefadeks G-200 kromatografisi ile incelenmiştir. Söz konusu çalışma sonucu enzimin molekül ağırlığı 358.000, alt birim molekül ağırlığı ise yaklaşık 60.000 olarak tesbit edilmiştir (17). Wart, sığır lensinden saflaştırdığı LAP'ın alt birim molekül ağırlığı SDS'lı poliakrilamid jel elektroforezi ile 54.000 olarak bulmuştur. Bu sonuçtan giderek 6 alt birimli LAP'ın molekül ağırlığının 320.000 olduğu tesbit edilmiştir (6). Ayrıca sığır lensinden saflaştırılan enzimin, molekül ağırlığının da 54.000 olarak bulunduğu bir çok kaynakta kayıtlıdır (6,7,10,18).

Bunlardan da anlaşılacağı üzere, LAP molekül yapısı bakımından dokudan dokuya pek önemli fark göstermemektedir. Aynı zamanda molekül yapısını aydınlatmak için kullanılan metodların sonucunda önemli farklılıklar görülmediği için, poliakrilamid jel elektroforezi her laboratuvarda uygulanabilir ve metod olarak ortaya çıkmaktadır.

SUMMARY :

THE STUDY ON THE PURIFICATION LEVEL AND SUBUNITS OF THE LEUCINE AMINOPEPTIDASE PURIFIED FROM HUMAN PLACENTA BY POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS

The activity of leucine aminopeptidase is very high in serum during the pregnancy. Investigation on the properties of leucine aminopeptidase purified from

other tissues assists to find their source. Thus, we purified leucine aminopeptidase from human placenta by a modified method.

The study on the purification degree and the subunits of the leucine aminopeptidase was made by polyacrylamide gel electrophoresis. Fraction enzyme showed a single band with polyacrylamide gel electrophoresis. The molecular weight of the enzyme subunit was found as 51.000 dalton using sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.

KAYNAKLAR

1. İbrahim, F.K., Fattah, M.M., Ramadan, M.A., et al.: Leucine aminopeptidase activity in maternal, cord blood and in placenta of normal pregnancy and in pre-eclampsia. *Acta Obstet Gynecol Scand.*, 65 (1): 45-47, 1976.
2. Rutenburg, A.M., Goldbarg, J.A., Pineda, E.P.: Leucine Aminopeptidase activity. *New Engl. J. Med.* 259 (10): 469, 1958.
3. O'brien, D., Ibbott, F.A., Robgerson, D.O.: *Labortatory manuel of pediatric micra-biochemical technigues*, S. 208-210, 4th ed., London, 1968.
4. Pineda, E.P., Goldbarg, J.A., Rutenburg, A.M.: Serum leucine aminopeptidase in pancreatic and hepatobilliary diseases. *Gastroenterology* 38: 689-712, 1960.
5. Lynch, M.J., Raphael, S.S., Mellor, L.D.: *Medical laboratory technology and and clinical pathology*, 2 nd ed., 1969, p 214, 306.
6. Wart, H.E., Lin, S.H.: Metal binding stoichiometry and mechanism of metal ion modulation of the activity of porcine kidney leucine aminopeptidase. *Biochemistry* 20: 3682, 3689, 1981.
7. Rownd, C.M.: Studies on the active site size of leucine aminopeptidase. *Disser. Abst. Inter.* 45: 850, 1984.
8. Himmelhoch, S.R.: Leucine aminopeptidase: A zinc metalloenzyme. *Archives of Biochemistry and Biophys.* 134: 597-602, 1969.
9. Burch, R.E., Williams, R.V., Henry, K.J., et al.: Serum and tissue enzyme activity and trace-element *Pig. Clin. Chem.* 21(4) : 569-577, 1975.
10. Taylor, A., Tisdell, F.E., Carpenter, F.H.: Leucine aminopeptidase (bovine lens): Synthesis and kinetic properties of ortho-, meta, and kinetic properties of ortho-, meta, and para-substituted leucyl-anilides. *Arch. Biochem. Biochem. Biophys.* 210 (1): 90-97, 1981.

11. Smith, E.L., Hill, R.L.: Leucine aminopeptidase. Boyer, P.D., Lardy, H., Myrback, K. (ed). The Enzyme, Vol. 4,5. 37-61, Academic Press, New York, 1960.
12. Ornstein, L.: Disc electrophoresis: I. Background and theory. Ann. N.Y. Acad. Sci. 121: 321, 1964.
13. Weber, K., Osborn, M.: The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 244(16): 4406-4412, 1969.
14. Goldman, D.R., Schlesinger, H., Segal, S.: Isolation and characterization of the brush border fraction from newborn rat renal proximal tubule cells. Biochim. Biophys. Acta. 419: 251-260, 1976.
15. Soysal, S.T.: Glukoz, 6-fosfat dehidrogenaz enziminin insan eritrositlerinden saflaştirılması, Doçentlik Tezi, Erzurum, 1980.
16. Shus, L.: Preparative acrylamide gel electrophoresis: Continuous and techniques, Colowick, S.P., Kaplan, N. O (derleyenler), Method in Enzymology, Cilt XXII, S. 412, Academic Press, New York, 1971.
17. Kohno, H., Kanda, S., Kanno, T.: Immunoaffinity purification and characterization of leucine aminopeptidase from human liver. J. Biol. Chem. 261 (23): 10744-10748, 1986.
18. Allen, M.P., Yamada, A.H., Carpenter, F.H.: Kinetic parameters metal-substituted leucine aminopeptidase from bovine lens. Biochemistry. 22(16): 3788-3783, 1983.