

İNSAN SPERMLERİNDEN SAFLAŞTIRILAN AKROZİN SAFLIĞININ VE ALT BİRİMLERİNİN POLİAKRİLAMİD JEL ELEKTROFOREZİ İLE ARAŞTIRILMASI

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

ÖZET :

İnfertilitede çok önemli görevi olan akrozin enzimini önceden insan spermlerinden modifiye bir metotla saflaştırdık. Bu enzimin, 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 poliakrilamid jel elektroforezi ile elde edilen bandın, diğer standart maddelerin bantlarıyla karşılaştırılması sonucunda da enzimin alt birim molekül ağırlığı 48.000 olarak bulundu.

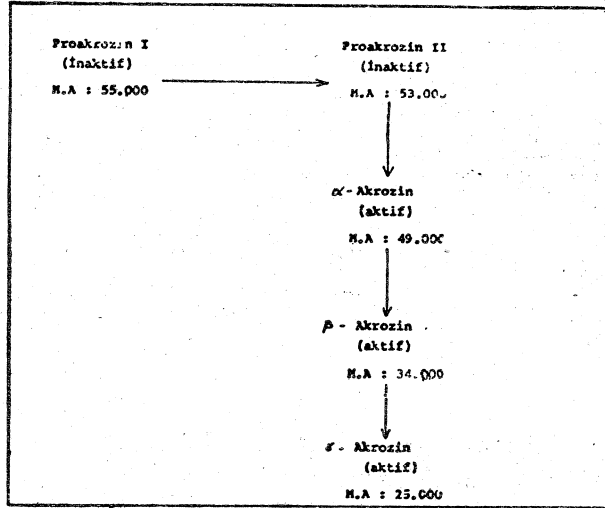
GİRİŞ VE AMAÇ

Akrozin, türüne özgül bir enzimdir(1). Silaloglikoprotein yapısındadır (2,3) Proteinleri arginin kısmında fazla, lizin kısmında ise daha az derecede parçalar (3,4) Akrozin intraselüler ve ekstrasellüler fonksiyonun önemli katalitik regülatörleri olan serin proteinazlar sınıfındandır(5). Akrozin bu grup içinde, üreme fonksiyonlarında görev yapan enzimdir(6). Akrozin amino uç dizisi, plazmin ve kimotripsinle homologdur. Friedberg ve arkadaşları (4) aktif akrozin ile zimojenin (proakrozin) amino uç dizilerinin aynı olduğunu gösterdiler. Proakrozin 6, akrozin 4 disülfid köprüsü içerir(4). Ancak enzimin SH grupları katalize katılmaz. Proakrozin ve akrozinin molekül ağırlıkları çeşitli memeli türlerinde farklı farklıdır. Proakrozinin molekül ağırlığı 42.000-88.000 arasında, akrozinin molekül ağırlığı ise 25.000-70.000 arasındadır. Ancak genel kabule göre ortalama molekül ağırlıkları proakrozin için 70.000 ve akrozin için 30.000 kadardır (7).

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

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

Araştırmacılar proakrozinin akrozin'e dönüşüm şekillerini de incelemişlerdir. Bu çalışmalar (7,8,9,) sonucunda verilen dönüşüm zinciri Şekil-1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Proakrozinin Akrozin'e Dönüşüm Zinciri

Akrozomal bir proteinaz olan akrozinin ovumunzona pellucidasını sindirerek fertilizasyona yardımcı olduğu bilinmektedir(10,11). Ülkemizde infertilete vakalarının az olmadığı gözönüne alındığından, çalışmalarımızda bu enzimin iyice tanınmasını ve klinik incelemelere ışık tutmasını hedefledik.

MATERYAL VE METOD

Normal poliakrilamid jel elektroforezi (PAJE), enzimin saflığını kontrol için yapıldı. Jel Weber'e göre hazırlandı (12). Uygulamada 50 µl enzim çözeltisi, 5 µl bromfenol mavisi(öncül bileşik), 1 damla gliserol 50 µl tampon vortex ile karıştırıldı. Bu karışımdan 50 µl kolonların üst ucuna tatbik edildi ve karıştırıldı. Bu karışımdan 50 µl kolonların üst ucuna tatbik edildi ve üzerleri dikkatli bir şekilde elektroforz yapılacak tampon ile dolduruldu. Tüp başına 5 mA numune jele geçtikten sonra 8mA/tüp güç tatbik edildi. Bromfoenol mavisi jel çıkışına 3 cm kalıncaya kadar, tahminen 8 saat kadar yürütüldü. Kolonlar tanktan çıkarıldıktan sonra 2 saat kadar 1.25 g coomassie brillant bulue, 545 ml % 50 metanol ve 46 ml glasiyal asetik asit ihtiva eden boya çözeltisi ile boyandı. Boyama süresi sonunda boya, asetik asit/metanol/su (75/50/875) çözeltisi ile boya tamamen kolondan çıkarılincaya kadar yıkandı. Boya çözeltisi her 4 saatte bir yenilendi. Bu jeller kapaklı tüplerde boya çıkarıcı çözelti içinde oda ısısında bekletildi.

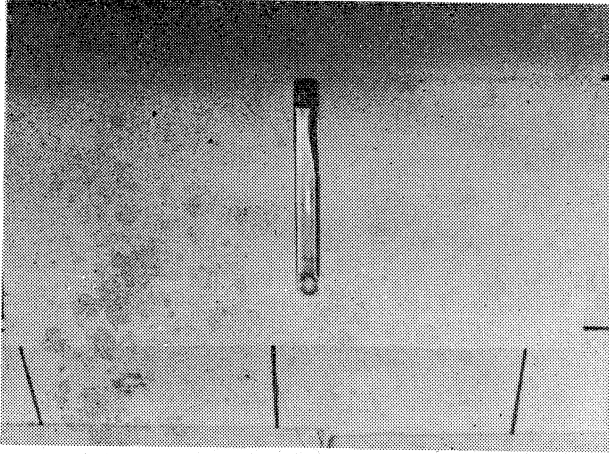
Sodyum dodesil sülfatlı (SDS) PAJE inde bovine albumin (67.500), α -amilaz (45.000), pepsin (35.000) ve ürikaz (100.000) standart protein olarak kullanıldı. Numuneler % 1 SDS ve % 1 2- merkaptotanol ile 2 dakika kaynar su banyosunda tutularak denatüre edildi. Sonra numune ve standart proteinlerden 0.2 ml, 1 dama gliserol, 10 μ l öncül boya karıştırılarak kolonlara tatbik edildi. Öncül boya çıkışa 3 cm kalıncaya kadar yürütüldü. Sonra kolondan çıkarılan jeller 2 saat coomassie brillant blue R-250 ile boyandı. Boyayı çıkarmak için asetik asit/su/metanol çözeltisi ile 4-6 saatte bir boya çıkarıcı çözeltiyi değiştirmek suretiyle 20 saat muamel edildi.

Her kolondaki protein standartların ve numunelerin hareketlilikleri aşağıdaki formülden hesaplandı.

$$\text{Hareketlilik} = \frac{\text{Protein bandının aldığı yol}}{\text{Boyadan sonraki jel boyu}} \times \frac{\text{Boyadan önceki jel boyu}}{\text{öncülboyanın aldığı yol}}$$

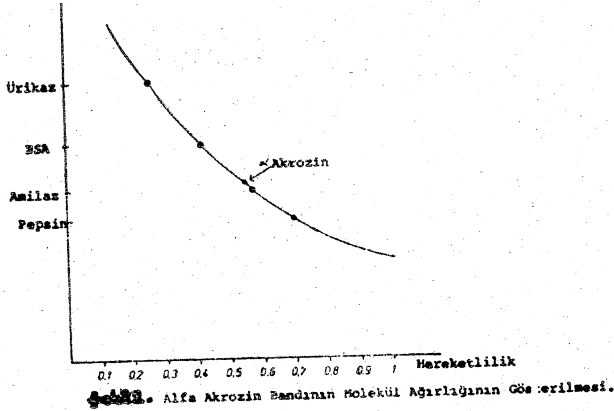
BULGULAR

Enzim saflığı poliakrilamid jel elektroforezi ile incelendi. Normal PAJE inde bir tek band elde edildi. Elde edilen tek bant enzimin saflaşmış olduğunu gösterdi (Resim-1).



Resim 1

Saflaştırılmış enzimden alınan numunede SDS ili PAJE yapıldıktan sonra elde edilen bantın hareketliliği hesaplandı ve standartlara göre çizilen molekül ağırlığı grafiğinden molekül ağırlığı 48.000 olarak bulundu (Şekil-2).



TARTIŞMA

Enzim çözeltisi ile yaptığımız normal PAJE sonucu tek bant görülmesi saf-
lızın bir işareti sayıldı. SDS-PAJE ile molekül ağırlığı tayin edildi. SDS kuaterner
yapıları bozar ve böylece proteinlerin her ünitesi sabit negatif bir yük kazanmış
olur (13). Jel elektroforezinde değişik jel büyüklükleri, değişik pH lar ve değişik
akımların kullanıldığı çalışmalar vardır (5,7,9,14) Aynı zamanda SDS-PAJE
ile yapılan molekül ağırlığı tayinin de değişik sonuçlar elde edilmiştir. Polokoski
ve arkadaşları (15) insan akrozinin molekül ağırlığını 30.000 dalton civarında
bulmuşlardır. Mukerji ve Meizel (16) tavşan akrozini molekül ağırlığını 38.000
olarak bulmuştur. Proakrozin SDS-PAJE ile 55.000 dalton verir. Titrasyon-
dan sonra nötral pH da proakrozin kararsız akrozin'e döner ve bunun da mole-
kül ağırlığı 48.000 dir ya da molekül ağırlığı 35.000 olan çok daha stabil formuna
değişir (4). Proakrozinin molekül ağırlığı jel kromatografisi ile 58.000 olarak
bulunmuştur (17). Polakoski ve Parrish (9) domuz akrozininin α , β , γ , diye 3
formunu bulmuşlardır. Bunların molekül ağırlıkları sırasıyla 49.000, 34.000 ve
25.000 dir. Bu sonuçlar insan akrozinine yakındır. İnsan akrozini için bu de-
ğerler $\alpha = 50.000$, $\beta = 34.000$ ve $\gamma = 40.000$ olarak bulunmuştur (18).

Çalışmamızda akrozinin molekül ağırlığını pH '8' de 48.000 olarak tespit
ettik. Alkali ortamda inkübasyon sonucu proakrozin alfa akrozin formuna kan-
titatif olarak dönmektedir (19). Tesbit ettiğimiz 48.000 dalton ağırlığındaki ak-
rozin alfa akrozindir ve bulgularımız literatür ile uygunluk göstermektedir
(4,9,18-22).

Bütün bunlardan anlaşılacağı üzere, akrozin molekül yapısı bakımından
çeşitli hayvan nevilerinde pek önemli fark göstermemektedir.

SUMMARY

THE STUDY ON THE PURIFICATION LEVEL AND SUBUNITS OF THE ACROSIN PURIFIED FROM HUMAN SPERMATOZOA BY POLYACRYLAMIDE GEL ELECTROPHORESIS

We had purified previously acrosin, which has an important role in infertility, from human spermatozoa. The study on the purification degree and the subunits of the acrosin was made by polyacrylamide gel electrophoresis. Fraction enzyme showed a band with polyacrylamide gel electrophoresis. The molecular weight of enzyme subunit was found as 48.000 dalton using sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.

KAYNAKLAR

1. Gaddum, P., Blandau, R.J.: Proteolytic reaction of mammalian spermatozoa on gelatin membranes. *Science* 170: 749-751, 1970.
2. Straus, I.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.
3. Schleunung, W.D., Kolb, H.J., Hell, R., Fritz, H.: Boar acrosin: Amino acid composition, amino terminal residue and molecular weight estimations by ultracentrifugation. *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.* 356: 1923-1929, 1975.
4. 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.
5. Scheiner, C., Quigley, J.P.: Detection, identification, and partial characterization of serine proteases and esterases in biological systems. *Anal. Biochem.* 122: 58-69, 1982.
6. Van Blerkom, J., Motta, P.: The cellular basis of mammalian reproduction, Urban and Schwarzenberg, Munich, p.135-163, 1979.
7. Mukorji, S.K.: Studies on the rabbit proacrosin-acrosin System. *Arch. Biochem. Biophys.* 230: 412-423, 1984.
8. Polakoski, K.L., Mc. Roric, A.: Boar acrosin. II. classification, inhibition, and specificity studies of a proteinase from sperm acrosomes. *J. Biol. Chem.* 248: 8183-8188, 1973.
9. Palakoski, 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.

10. 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.
11. Stambaugh, R., Smith, M.: Amino acid content of rabbit acrosomal proteinase and its similarity to human trypsin. *Science* 186: 745-746, 1974.
12. Weber, K., Osborn, M.: The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *The Journal of Biological Chemistry*, 1969.
13. Scrimgeour, K.G. *Chemistry and Control of Enzyme Reactions*. Academic Press. London, 1977, p 68.
14. Berruti, G: Multiple forms of bovine acrosin: purification and characterization. *Comp. Biochem. Physiol.* 698-323-328, 1981.
15. Polakoski, K.L., Mc. Rorie, R.A., Williams, W. L.: Boar acrosin I. purification and preliminary characterization a proteinase from boar sperm acrosomes. *J. Biol. Chem.* 248: 8178-8182, 1973.
16. Meizel, S., Mukerji, S.K.: Proacrosin from rabbit epididymal spermatozoa: partial purification and initial biochemical characterization. *Biol. Reprod.* 13: 83-93, 1975.
17. Cechova, D., Jonakova, V., Zelezna, B., Petelikova, J.: Ramproacrosin: A simple method for isolation of proacrosin free of inhibitors, and proacrosin autoactivation studies. *Andrologia* 16: 477-481, 1984.
18. Siegel, M.S., Bechtold, D.S.: Kopta, C.I., Polakoski, K.L.: Quantification and partial characterization of the hamster sperm proacrosin-acrosin System. *Biol. Reprod.* 35: 485-491, 1986.
19. Parrish, R.F., Polakoski, K.L.: Improved method for preparation and purification of boar m-acrosin. *Biol. Reprod.* 25: 197-201, 1981.
20. Parrish, R.F., Polakoski, K.L.: Boar m-acrosin *J. Biol. Chem.* 253: 8428-8432, 1978.
21. Elce, J.S., McIntyre, E.: Purification of bovine and human acrosin. *Can. J. Biochem.* 60: 8-14, 1982.
22. Weiner, S.J., Seibel, G.L., Kollman, P.A.: The nature of enzyme catalysis in trypsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83: 649-653, 1986.