

T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İNSAN SERUM VE DOMUZ BÖBREK PROLİDAZININ
ÖZELLİKLERİ

Emine Sibel NAMIDURU

88313

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Ocak - 1999

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğünün Onayı

Prof. Dr. Yavuz COŞKUN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez çalışmasının bir "Yüksek Lisans" derecesi için uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

Y. Özdemir
Doç. Dr. Yüksel ÖZDEMİR
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımdan okunmuş ve her yönü ile bir "Yüksek Lisans" tezi olarak uygun ve yeterli bulunmuştur.

Y. Özdemir
Doç. Dr. Yüksel ÖZDEMİR
Danışman

Tez Jürisi:

Doç. Dr. Yüksel ÖZDEMİR

Doç. Dr. Emin ERDAL

Yrd. Doç. Necat YILMAZ

Y. Özdemir
E. Erdal
N. Yılmaz

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
TABLO LİSTESİ.....	vi
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
KISALTMALAR.....	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Prolidaz.....	3
2.1.1. Tanımı.....	3
2.1.2. Yapısı.....	4
2.1.3. İşlevi.....	5
2.2. Kollajen Yapısı ve Biyosentezi.....	6
2.2.1. Kollajen Biyosentezi.....	9
2.3. İnsan Prolidazının Gen Lokalizasyonu ve Primer Yapısı.....	10
2.4. Prolidaz İzoenzimleri.....	12
2.5. Prolidaz İnhibitörleri.....	15
2.6. Prolidaz Eksikliği.....	16
2.6.1. Prolidaz Eksikliğinin Tanı ve Tedavisi.....	20
2.7. Diğer Hastalıklarda Prolidaz.....	22
2.8. Prolidaz Aktivite Düzeyinin Ölçülmesinde Kullanılan Yöntemler....	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	26
3.1. Gereçler.....	26

3.1.1. Kullanılan Aletler.....	26
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	26
3.2. Yöntem.....	27
3.2.1. Örneklerin Hazırlanması.....	27
3.2.2. Prolidaz Aktivite Düzeyini Ölçüm Yöntemi.....	28
3.2.2.1. Ayıraçlar.....	29
3.2.2.2. İşlem.....	31
3.2.2.3. Hesap.....	33
3.3. Planlanan Çalışma Şeması.....	34
4. BULGULAR.....	35
4.1. Stabilite.....	35
4.2. Analiz Koşullarının Saptanması.....	35
4.3. Prolidaz Aktivitesi Üzerine Mn^{+2} 'nin Etkisi.....	36
4.3.1. Serum Prolidazı.....	36
4.3.2. Domuz Böbrek Prolidazı.....	37
4.4. Prolidaz Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkisi.....	38
4.5. Metal İyonlarının Mn^{+2} ile Birlikte Kullanılarak Enzim Aktivitesindeki Değişikliklerin İncelenmesi.....	39
4.6. Tampon pH'sının Enzim Aktivitesine Etkisi.....	40
4.6.1. Serum Prolidazı.....	40
4.6.2. Domuz Böbrek Prolidazı.....	41
4.7. Tampon Konsantrasyonunun Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	42
4.8. Serum Prolidazının Michaelis Menten Eğrisi.....	43
4.8.1. Glisil-Prolin Dipeptidi için.....	43
4.8.2. Alanil- Prolin Dipeptidi için	44
4.9. Domuz Böbrek Prolidazının Michaelis Menten Eğrisi.....	45
4.9.1. Glisil-Prolin Dipeptidi için.....	45

4.9.2. Alanil-Prolin Diipeptidi için.....	46
4.10. EDTA'nun Prolidaz Enzimi Aktivitesine Etkisi.....	47
4.11. İAA'in Prolidaz Aktivitesi Üzerine Etkisi.....	49
4.12. p-CMBA'in Prolidaz Aktivitesine Etkisi.....	51
4.13. İAA ve Glutasyonun Birlikte ilavesinin Prolidaz Aktivitesine Etkisi.....	53
5.TARTIŞMA VE SONUÇLAR.....	55
6.KAYNAKLAR.....	67
ÖZGEÇMİŞ.....	74



ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

İNSAN SERUM VE DOMUZ BÖBREK PROLİDAZININ ÖZELLİKLERİ

Emine Sibel NAMIDURU

Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Biyokimya Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Yüksel ÖZDEMİR

Ocak 1999 - 74 Sayfa

Bu çalışmanın amacı, insan serum ve saf domuz böbrek prolidazının optimal deney koşullarının ve kinetik özelliklerinin saptanmasıdır. Serum kaynağı olarak 30 sağlıklı bireyin kanlarından oluşturulan serum havuzu kullanıldı. Ayrıca enzim aktivitesi üzerine bazı metal iyon (Mn^{+2} , Fe^{+2} , Zn^{+2} , Hg^{+2} , Mg^{+2} , Cu^{+2} ve Sr^{+2}) ve maddelerin (EDTA, İAA, p-CMBA ve glutatyon) etkileri araştırıldı.

Her iki enzimde de optimal aktivite, final konsantrasyonu 2.5mmol/l Mn^{+2} ve 40 mmol/l tampon (pH: 8) kullanılarak 2 saat 37 °C'da preinkübe edilerek elde edildi. Mn^{+2} nin serum prolidazının aktivitesini

23 kez, domuz böbrek prolidazının aktivitesini 9.5 kez artırdığı tespit edildi.

Serum prolidazı için optimum substrat (glisil-prolin) final konsantrasyonu 30 mmol/l olarak bulunurken, domuz böbrek prolidazı için 40 mmol/l olarak saptandı. İnsan serum ve domuz böbrek prolidazının bulunan K_m değerleri, glisil-prolin için sırasıyla 13mmol/l ve 11mmol/l, alanil-prolin için 14mmol/l ve 12mmol/l olarak tespit edildi. Mn^{+2} dışındaki metal iyonlarının serum prolidazını aktive etmediği, domuz böbrek prolidazını ise düşük oranlarda aktive ettiği belirlendi. Bu sonuçlardan enzimin en iyi aktivatör katyonunun Mn^{+2} olduğu bir kez daha anlaşıldı. EDTA, İAA ve p-CMBA'in hem serum hem de domuz böbrek prolidazının aktivitesini inhibe ettikleri, bu inhibisyonun da preinkübasyon aşamasında inkübasyon aşamasına nazaran daha fazla olduğu belirlendi.

Sonuç olarak;enzimin kolay ve doğru ölçümü ile optimal deney koşullarının ve özelliklerinin bilinmesinin bu konuda yapılacak daha ileri çalışmalara ışık tutacağı kanısındayız.

Anahtar kelimeler : Serum prolidaz, domuz böbrek prolidaz, kinetik özellikler, inhibisyon

ABSTRACT

M.S. Thesis

THE PROPERTIES OF HUMAN SERUM AND PORCINE KIDNEY PROLIDASE

Emine Sibel NAMIDURU

Gaziantep University Graduate School of Health Sciences

Department of Biochemistry

Supervisor : Assoc.Prof. Yüksel ÖZDEMİR

January 1999 - 74 Pages

The aim of this study is to evaluate the optimal conditions of the assay and kinetic properties of human serum and purified porcine kidney prolidase. The human serum prolidase activity was obtained by using sera pool from 30 healthy subjects. The effects of some metal ions (Mn^{+2} , Fe^{+2} , Zn^{+2} , Hg^{+2} , Mg^{+2} , Cu^{+2} , Sr^{+2}) and substances (EDTA, IAA, p-CMBA and glutathione) were also investigated.

Optimum conditions of serum and porcine kidney prolidase assay were found as follows ; preincubation at 37 °C, for 2 hours with final Mn^{+2} concentration 2.5 mmole/l and buffer concentration 40 mmole/l (pH : 8). With Mn^{+2} ion the serum and porcine kidney prolidase activities were increased 23 and 9.5 times respectively. The final substrat concentration (gly-pro) of serum prolidase was 30 mmole/l and it was 40 mmole/l for

porcine kidney prolidase. The K_m values of serum and porcine kidney prolidase were found as 13 mmole/l, 11 mmole/l for gly-pro and 14 mmole/l, 12 mmole/l for ala-pro substrates respectively. There is no activator effects of used metal ions except Mn^{+2} on human serum enzyme activity. However these metals indicate partial activator effect on porcine kidney prolidase. It is shown that Mn^{+2} ion is the most activator agent for prolidase. EDTA, IAA; and p-CMBA have been inhibited both human serum and porcine kidney prolidase but this effect was more effectively in preincubation compare to incubation.

As a result of this study we thought that known of optimal working conditions and specifications of enzyme with an easy and true assay would be valuable for further investigations.

Key words : Serum prolidase, porcine kidney prolidase, kinetic properties, inhibition.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince biyokimya alanındaki bilgi birikimi ve deneyimi ile beni, disiplinli ama anlayışlı bir idareci olarak çalışmalarımı yönlendiren tez danışmanım değerli hocam Sayın Doç. Dr. Yüksel ÖZDEMİR'e,

Eğitimime katkılarından dolayı Sayın Yrd. Doç. Dr. Necat YILMAZ'a ve Yrd. Doç. Dr. İclal MERAM'a

Ayrıca başta Uzman Dr. Binnur ERBAĞCI ve Yük. Kim. Jale ÖZASLAN olmak üzere birlikte çalıştığım araştırma görevlisi ve kimyager arkadaşlarıma, merkez biyokimya laboratuvarında görevli arkadaşlarıma ve Kızılay Kan Merkezi çalışanlarına,

Her zaman bana destek olan aileme teşekkür ederim.

TABLO LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 2.1 İnsan prolidaz I ve II izoenzimlerinin doku dağılımları.....	14
Tablo 2.2 Dört değişik substrat için hasta, annesi ve kontrollerin Vmax ve Km değerleri.....	19
Tablo 4.1 Bazı metal iyonlarının insan serum ve domuz böbrek prolidaz aktivitesi üzerine etkisi.....	39
Tablo 4.2 Serum ve domuz böbrek prolidazının aktivitesine Mn^{+2} ile birlikte metal iyonlarının etkisi.....	40
Tablo 4.3 Preinkübasyon aşamasında EDTA ilavesinin prolidaz aktivitesi üzerine etkisi.....	48
Tablo 4.4 İnkübasyon aşamasında EDTA ilavesinin prolidaz aktivitesi üzerine etkisi.....	49
Tablo 4.5 Preinkübasyon aşamasında eklenen İAA'in serum ve domuz böbrek prolidaz aktivitesi üzerine etkisi.....	50
Tablo 4.6 İnkübasyon aşamasında eklenen İAA'in enzim aktivitesine etkisi.....	51
Tablo 4.7 p-CMBA' in preinkübasyon aşamasında ilavesi ile serum ve domuz böbrek prolidaz aktivitesi üzerine etkisi	52
Tablo 4.8 İnkübasyon aşamasında p-CMBA'nın ilavesinin serum ve domuz böbrek prolidaz aktivitesi üzerine etkisi.....	53
Tablo 4.9 Glutasyon ve İAA'in preinkübasyon aşamasında ilavesi ile enzim aktivitesindeki değişiklik.....	54
Tablo 4.10 Glutasyon ve İAA'in inkübasyon aşamasında ilavesi ile enzim aktivitesindeki değişiklik.....	54

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1 Kollajen yıkımında prolidaz ve prolinazın yeri.....	6
Şekil 2.2 Memeli kollajeninde bulunan prolin ve hidroksiprolin izomerleri.....	8
Şekil 2.3 Prolinin metabolik yollarla bağlantısı.....	8
Şekil 2.4 Kollajenin biyosentezi.....	9
Şekil 2.5 Prolidaz genini içeren kromozom 19.....	10
Şekil 2.6 Prolidaz cDNA'nın amino asit ve nükleotid dizisi.....	11
Şekil 3.1 Ninhidrin reaksiyonu.....	28
Şekil 4.1 İnsan serum prolidaz aktivitesi üzerine Mn^{+2} 'nin etkisi.....	37
Şekil 4.2. Domuz böbrek prolidaz aktivitesi üzerine Mn^{+2} 'nin etkisi...	38
Şekil 4.3 Serum prolidaz aktivitesine tampon pH'sının etkisi.....	41
Şekil 4.4 Domuz böbrek prolidaz aktivitesine tampon pH'sının etkisi..	42
Şekil 4.5 Değişik tampon konsantrasyonlarının serum ve domuz böbrek prolidazı aktivitesi üzerine etkisi.....	43
Şekil 4.6 Serum prolidazının glisil-prolin substratı kullanılarak elde edilen Michaelis-Menten eğrisi.....	44
Şekil 4.7 Serum prolidazının alanil-prolin substratı kullanılarak elde edilen Michaelis-Menten eğrisi	45
Şekil 4.8 Domuz böbrek prolidazının glisil-prolin substratı kullanılarak elde edilen Michaelis-Menten eğrisi.....	46
Şekil 4.9 Domuz böbrek prolidazının alanil-prolin substratı kullanılarak elde edilen Michaelis-Menten eğrisi.....	47

KISALTMALAR

A	: Adenin
ATPaz	: Adenozin trifosfataz
p-CMBA	: p-Kloromerküribenzoik asit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
cDNA	: Komplementer DNA
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
G	: Guanin
İAA	: İyodoasetamid
K _m	: Michaelis Menten sabiti
pH	: $\log 1/H^+$
RNA	: Ribonükleik asit
mRNA	: Messenger RNA
T	: Timin
V _{max}	: Maksimum hız

Amino Asit ve Dipeptidler

Ala	: Alanin
Ala-pro	: Alanil prolin
Gly	: Glisin
Gly-pro	: Glisil prolin
Hyp	: Hidroksiprolin
Gly-Hyp	: Glisil hidroksiprolin
Leu-pro	: Lösil prolin
Met-pro	: Metiyonil prolin
Phe-pro	: Fenilalanil prolin

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Prolidaz (EC 3.4.13.9) C-terminalinde prolin veya hidroksiprolin içeren dipeptidlerin hidrolizini katalizleyen bir iminodipeptidazdır. Bu hidroliz reaksiyonu, özellikle kollajen gibi yüksek miktarda (% 25) imino asit içeren proteinlerin hücre içi yıkımında önemli bir basamaktır (Dolenga ve Hechtman 1992). Hidroliz sonucu oluşan prolin yeniden döngüye girerek yeni protein sentezlerinde kullanılırken, hidroksiprolin idrarla atılmaktadır (Milligan ve Brown 1989, Endo ve Tanoue 1990).

Prolidaz, insan dokularında yaygın dağılım göstermektedir. Enzimin aktivitesi bağıl olarak böbrek, intestinal mukoza, eritrositlerde yüksek, karaciğer ve plazmada düşüktür. Plazmadaki enzim aktivitesi, eritrositdeki enzim aktivitesinin yaklaşık % 6'sı kadardır. İnsan serumunda sadece prolidaz I izoenzimi mevcut iken, dokularda (karaciğer, böbrek, duodenum, ileum, jejunum, pankreas, dalak, kalp, beyin, cilt fibroblastları ve prostat) ve eritrositlerde prolidaz I ve II izoenzimlerinin her ikisi de bulunmaktadır. Buna plazmadaki albüminin inhibitör etkisinin neden olduğu öne sürülmektedir, bu da plazmadaki prolidaz deneylerinde sorunlara neden olmaktadır (Cosson ve Myara 1992).

Bu çalışmada öncelikle serum prolidaz aktivitesini saptamak için, eritrosit prolidaz aktivitesini ölçmede kullanılan yöntem modifiye edildi (Erbağcı ve Özdemir 1996). Bunun yanı sıra daha önce yapılan serum

prolidaz çalışmalarında kullanılan uzun preinkübasyon zamanı (24 saat) diğerk parametreler değıştirilerek kısaltıldı (Myara ve Myara 1984, Alparslan ve ark. 1993). İkinci aşama olarak da ; insan serum prolidazı ile saf enzim kaynağı olarak elimizde bulunan domuz böbrek prolidazının aynı reaksiyon şartlarına, inhibitör ve aktivatör maddelere karşı davranışları incelenip, sonuçları karşılaştırıldı.



BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1. Prolidaz

2.1.1.Tanımı

Prolidaz (EC 3.4.13.9. İmido dipeptidaz, Prolin dipeptidaz, Peptidaz D) hidrolazlar sınıfında bulunan bir enzimdir (Milligan ve Brown 1989, Endo ve Tanoue 1990, Dolenga ve Hechtman 1992). Hidrolazlar çeşitli bağların hidrolizini katalize eder. C-O, C-N, C-C ve fosforik anhidrit bağını da içeren diğer bazı bağların hidrolitik parçalanmasını katalize eden enzimler hidrolazlardır. Sistematik isimlendirmede daima hidrolaz kullanılmaktadır. Pratikte ise substratın önüne " az " eki getirilerek kullanılmaktadır (Yüreğir 1988, Gözükara 1994).

1937 yılında Bergmann ve Fruton glisil-L-prolin' in önceden bilinen peptidazlardan farklı, intestinal mukozal bir enzim tarafından hidroliz edildiğini saptamışlardır. O tarihten itibaren prolidaz adı verilen bu enzimin pek çok memeli dokusunda varlığı gösterilmiştir (Davis ve Smith 1957, Boright ve Scriver 1989). Enzim yaklaşık 60 yıl önceden bilinmesine rağmen, önemi 25 yıl önce enzim eksikliği çalışmaları yapıldığında anlaşılmıştır (Alparslan ve ark. 1993).

2.1.2. Yapısı

Prolidaz, mikroorganizmalarda ve birçok memeli dokusunda yaygın dağılım gösteren bir enzimdir. Doğal enzim sitoplazmik, homodimerik bir metalloenzimdir. Mn^{+2} ye ek olarak enzimin maksimum aktivitesi için aktif merkezinde arginin ve anyonik amino asit artıklarının bulunması gerekir. Mn^{+2} ile prolidaz aktivitesi 5-10 kat artmaktadır (Phang et al. 1995). Bilinen bütün proteazlar monomer yapıda olmasına rağmen tüm prolidazlar dimer yapı gösterir ve ancak bu şekilde katalitik aktiviteye sahiptirler (Mock ve Zhuang 1991).

Prolidaz glikoprotein yapısında olup % 0,5 (ağırlık olarak) karbonhidrat içermektedir. Prolidazın saptanan sekonder yapısında α -heliks (% 33), β -tabakalı (% 41) ve 30 potansiyel beta bağlantı bölgelerine eşit bir şekilde dağılmış hidrofobik ve hidrofilik alanlar bulunmaktadır. Enzimin primer sırası bilinen proteinlere benzemez, fakat bazı sıraları (% 29'dan fazlası) F_1 -ATP az'ın α ve β subünitelerinin sırasına benzerlik göstermektedir (Endo ve Tanoue 1988, Phang et al. 1995).

Reaktiflerle yapılan çalışmalar sonucu aktif merkezde tiyol grubu olduğu saptanmış ve bu grubun bloke olmasının aktiviteyi düşürdüğü tespit edilmiştir. Bu da sisteinin enzimin aktivitesi için gerekli olduğunu doğrulamaktadır. Doğal enzim için optimum pH: 7.6-7.8'dir ve izoelektrik nokta pH:4.4-4.5 olarak saptanmış olup, bu değer yapıdaki asidik amino asitlerin varlığını belirtmektedir (Phang et al 1995).

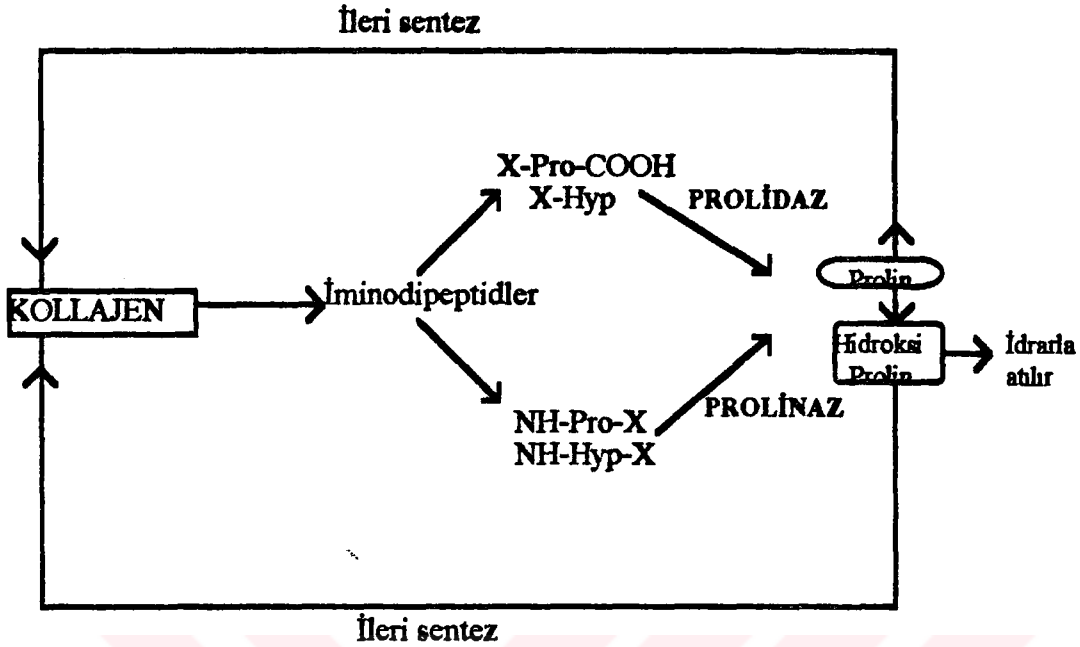
1991 yılında Mock ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada prolidazın metalloproteaz ailesinin diğer üyeleri ile aynı türe ait olduğu ve aktif bölgesinde argininin yanı sıra glutamat artıklarını da içerdiği bulunmuştur. Enzimde her monomer için iki aktif bölgenin olduğu saptanmış ve enzimin durumuna bağlı olarak bu iki aktif bölgenin substrat spesifikliğı ve Mn^{+2} ile preinkübasyon ortamındaki aktivasyonu bakımından da farklılık gösterdiği ortaya konmuştur (Bai ve Hu 1992).

2.1.3. İşlevi

Prolidaz C-terminalinde amino asiti prolin veya hidroksiprolin olan dipeptidleri hücre içinde hidroliz eder. Prolin yeniden döngüye girer ve yeni protein sentezlerinde kullanılırken, hidroksiprolin idrarla atılmaktadır (Milligan ve Brown 1989, Endo ve Tanoue 1990, Radzicka et al 1991).

Kollajen dokudaki imino asitlerin büyük bir kısmını, yaklaşık % 25'ini prolin ve hidroksiprolin oluşturduğundan, prolidaz kollajen yıkımında önemli rol oynamaktadır (Myara ve Myara 1984).

Kollajendeki prolinin % 90-95 'i bu yolla sağlanır (Scriver 1978). Prolidazın görevi hücre içi protein yıkımının son basamağında, özellikle yüksek miktarda prolin içeren prokollajenin yıkımının önemli aşamasındadır (Cosson ve Myara 1992, Myara et al 1994). Enzim için substrat kaynağı kollajen olup, iminodipeptidler kollajenin yıkımının son basamağında ortaya çıkmaktadır (Berardesca ve Fidell 1992).



Şekil 2.1. Kollajen yıkımında prolidaz ve prolinazın yeri (Myara ve Myara 1984)

Sonuç olarak prolidaz ; beslenme ile alınan proteinlerden ve vücuttaki depo kollajeninden imino asitlerin geri kazanılmasında önemli rol oynar (Phang et al 1995). C-terminalinde prolin veya hidroksiprolinin imino azotunu içeren peptid bağı bulunduran bileşiklerin hızlı hidrolizini katalizlediği bilinen tek enzim olduğu için spesifitesi yüksektir (Davis ve Smith 1957).

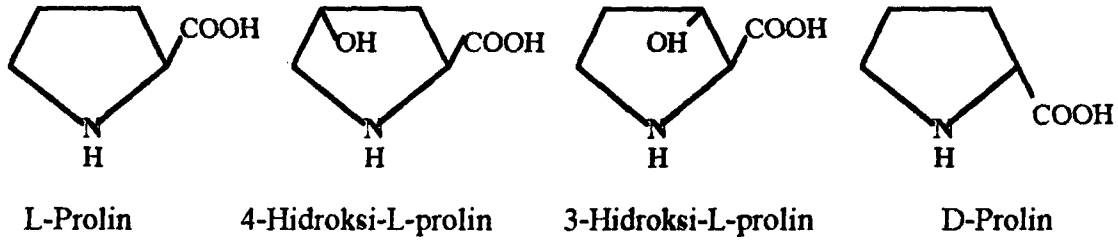
2.2. Kollajen Yapısı ve Biyosentezi

Kollajen terimi 1800 yıllarında Yunanca yapışkan kelimesinden türetilmiştir. Vücut proteinlerinin % 30, total vücut ağırlığının ise % 6 kadarını oluşturan kollajen insan vücudunda en yaygın olarak bulunan bağ dokusu proteindir. Ayrıca karaciğer dokusunun % 12-24, kıkırdığın % 50 , kemik korteksinin % 23, korneanın % 68 ve derinin % 72' si kadarını kollajen oluşturur.

Kollajen adı birbirleriyle yakın ilişkili, sert ve çözünmez bir protein ailesinden gelmektedir. Bu moleküller bütün vücutta yaygın olarak bulundukları halde tipleri ve organizasyonları kollajenin belli bir organda üstlendiği role bağlıdır. Bazı dokularda, kollajen ekstrasellüler matrikste veya göz sıvısında olduğu gibi yapıyı güçlendirecek şekilde jel gibi yayılmıştır (Onat ve Emerk 1997).

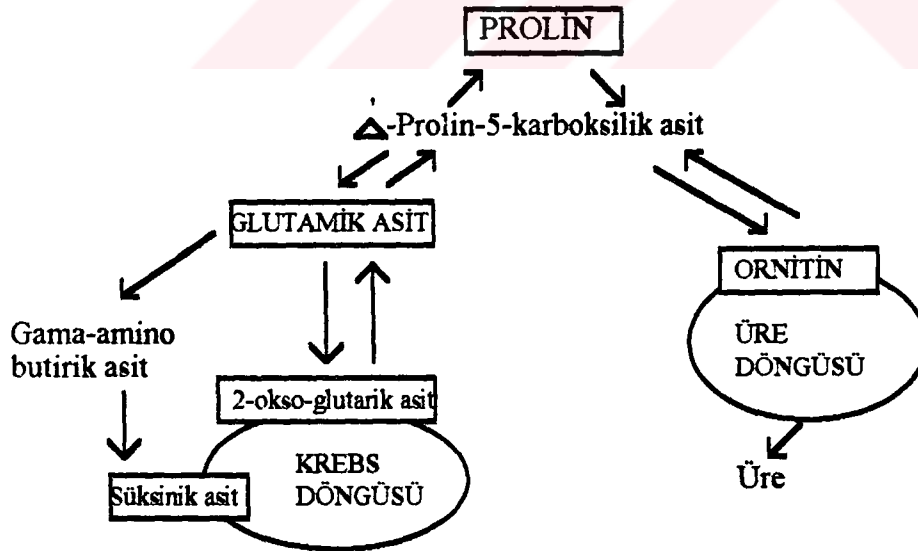
Kollajenin amino asit dizisi : Kollajenin primer yapısı polipeptid zincirindeki her üç pozisyondan birisinde en küçük amino asit glisininin bulunması açısından değişiktir. Glisin heliks yapıdaki kollajenin üç zincirinin bir araya geldiği kısıtlı alana sığabilmektedir. Glisin kalıntıları Gly-X-Y olarak tekrarlayan X' in genellikle prolin olduğu ve Y'nin sıklıkla hidroksprolin ve hidrosilizin olduğu düzenin parçasıdır. Bu yüzden molekülün büyük bir kısmı dizesi (Gly -X -Y) 333 olarak gösterilebilen bir politripeptid gibi kabul edilebilmektedir (Champe et al 1994).

Prolin ve hidroksprolin, prolidino halkasındaki azot atomuna bir hidrojen atomunun girmesi ile oluşmaktadır. Bunlar genelde imino asit ismiyle adlandırılır. L-prolin amino asitlerin hücre dışı havuzunun temel bileşenidir, bunu sadece glutamin ve alanin amino asitleri takip etmektedir. Hidroksprolin öncelikle vücut sıvılarındaki oligopeptidlerde bulunmaktadır. İnsanlarda hidroksprolinin yapısı 4-hidroksi-L-prolin'dir. Temel kaynağı ise diyet proteinlerinin yıkımı ve kollajendir. 3-hidroksi-L-prolin vücut sıvılarında daha az bulunur. Protein yapısında bulunan hidroksprolin peptide bağlı prolinin hidrosillenmesi ile oluşmaktadır (Phang et al 1995).



Şekil 2.2. Memeli kollajeninde bulunan prolin ve hidroksiprolin izomerleri

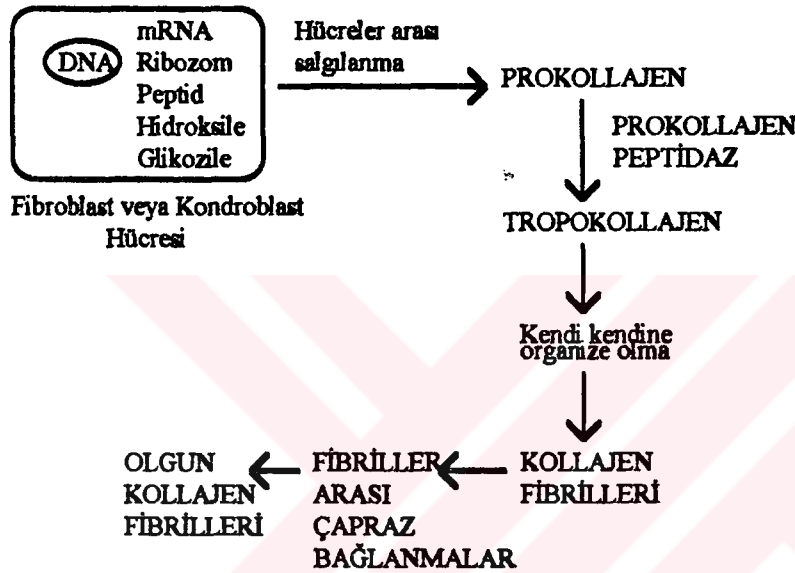
Prolin ayrıca krebs ve üre döngüleriyle metabolik olarak bağlantılıdır. Δ^1 -prolin-5-karboksilik asit prolin metabolizmasında iki döngüyü birbirine bağlayan bir pozisyonundadır. Prolinin karbon zincirinden krebs döngüsüne geçişi, tüm dokularda bilinen klasik yoldan 2-okso-glutarik asit metabolizması ile olur (Scriver 1978).



Şekil 2.3. Prolinin metabolik yollarla bağlantısı (Scriver 1978)

2.2.1. Kollajen biyosentezi

Kollajenin fibriller proteinin fibroblast hücrelerindeki sentezinden başlayarak olgun fibrillerin ortaya çıkmasına kadar geçirdiği bütün evreleri şekil 2.4.'deki gibi şematize etmek mümkündür.



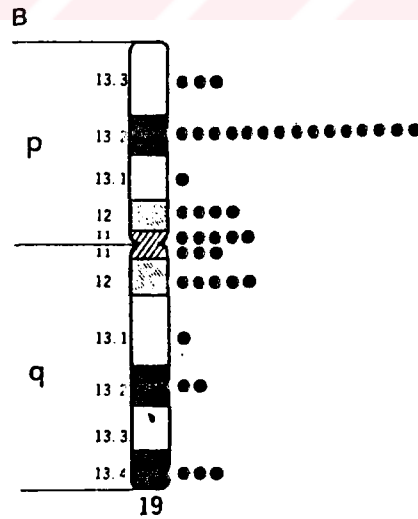
Şekil 2.4. Kollajenin biyosentezi (Gözükara 1994)

Prokollajen polipeptid zinciri önce fibroblast hücrelerinde sentezlenir. Hemen sonra zincirde yer alan bazı prolin ve lizin amino asitleri hidroksile edilir. Daha sonra ise bazı hidroksile lizinler glikozile edilmektedir. Hidroksilasyon ve glikozilasyon işlemleri tamamlanan polipeptid zincirleri prokollajen halinde hücreler arası alana salgılanmaktadır. Hücreler arası alana salgılanan prokollajen zincirlerinin N terminalindeki fazla peptid kısımları peptidaz enzimi ile koparılarak tropokollajen haline dönüştürülmektedir. Tropokollajenler kendi kendine organize olarak kollajen fibrillerini oluşturur. Bundan sonraki evrede ise fibriller arası çapraz bağlanmalarla yapı sağlamlaştırılıp olgun kollajen fibrilleri meydana gelmektedir (Gözükara 1994).

2.3. İnsan Prolidazının Gen Lokalizasyonu ve Primer yapısı

Prolidaz geni, insanda 19 numaralı kromozomun kısa kolunda lokalize olup (19p 13.2 bölgesi), sembolü PEPD 'dir. Enzimin komplementer DNA klonları insan karaciğeri ve plasental cDNA bankalarından izole edilmiştir (Endo ve Tanoue 1989, 1991). İnsan cDNA 'sı 1482 baz çiftinin okunmasıyla oluşur, bu da 493 amino aside karşılık gelmektedir (Mr:54,305) (Tanoue ve Endo 1989, 1990).

Prolidaz geninin yapısal organizasyonu da bilinmektedir. Genomik sıra oldukça geniştir ,en az 130 kb ve 15 ekson içermektedir. Kodlama sırası genomik sıranın % 2'sinden oluşur, ve eksonların uzunluğu 45 bp' den 528 bp'ye kadar uzanmaktadır. Exon intron bağlanmalarındaki tüm konformasyonlar GT/ AG kuralına uymaktadır (Phang et al 1995, Tanoue et al 1990).



Şekil 2.5.Prolidaz genini içeren kromozom 19 (Endo ve Tanoue 1989)

	-16 CCGGTGCCGGGCGAAC	-1
+1	ATGGCGGCGCCACCGGACCCTCGTTTTGGCTGGGGAATGAAACCCCTGAAGGTGCCGCTGGCGCTCTTTGCCTTGAACCGGCAGCGCCTG	90
+1	MetAlaAlaAlaThrGlyProSerPheTrpLeuGlyAspGluThrLeuLysValProLeuAlaLeuPheAlaLeuAsnArgGlnArgLeu	30
	K20 K23	
	TGTGAGCGGCTCGGGAAGAACCCTGCTGTGCAGCGCGGCTCCATCGTGGTCTGCAGGCGGGGAGGAGACTCAGCGCTACTGCACCGAC	180
	CysGluArgLeuArgLysAsnProAlaValGlnAlaGlySerIleValValLeuGlnGlyGlyGluGluThrGlnArgTyrCysThrAsp	60
	ACCGGGCTCCTCTCTCCAGGAGTCCTTCTTTCACTGGGCGTTCGGTGTCACTGAGCCAGGCTGCTATGGTGTCACTGATGTTGACACT	270
	ThrGlyValLeuPheLeuGlnGluSerPhePheHisTrpAlaPheGlyValThrGluProGlyCysTyrGlyValIleAspValAspThr	90
	GGGAAGTCGACCCTGTTTGTGCCAGGCTTCCTGCCAGCCATGCCACCTGGATGGGAAAGATCCATTCCAAGGAGCACTTCAAGGAGAAG	360
	GlyLysSerThrLeuPheValProArgLeuProAlaSerHisAlaThrTrpMetGlyLysIleHisSerLysGluHisPheLysGluLys	120
	K15	
	TATGCCGTGGACGACGTCCAGTACGTAGATGAGATTGCCAGCGTCTGACGTCACAGAAGCCCTCTGTCTCCTCACTTTGCGTGGCGTC	450
	TyrAlaValAspAspValGlnTyrValAspGluIleAlaSerValLeuThrSerGlnLysProSerValLeuLeuThrLeuArgGlyVal	150
	AACACGGACAGCGGCAGTGTCTGCAGGGAGGCTCCTTTGACGGCATCAGCAAGTTCGAAGTCAACAATACCATTCTTCACCAGAGATC	540
	AsnThrAspSerGlySerValCysArgGluAlaSerPheAspGlyIleSerLysPheGluValAsnAsnThrIleLeuHisProGluIle	180
	GTTGAGAGCCGAGTGTTTAAGACGGATATGGAGCTGGAGGTTCTGCGCTATACCAATAAAATCTCCAGCGAGGCCCACCGTGAGGTAATG	630
	ValGluSerArgValPheLysThrAspMetGluLeuGluValLeuArgTyrThrAsnLysIleSerSerGluAlaHisArgGluValMet	210
	AAGGCTGTAAAAGTGGGAATGAAAGAATATGGGTTGGAAAAGCCTCTCGAGCACTACTGCTACTCCCGGGGCGGCATGCCACAGCTCC	720
	LysAlaValLysValGlyMetLysGluTyrGlyLeuGluSerLeuPheGluHisTyrCysTyrSerArgGlyGlyMetArgHisSerSer	240
	K28 (Glu)	
	TACACCTGCATCTCGGCGAGTGGTGAGAACTCAGCCGTGCTACACTACGGACAGCGCGGAGCTCCCAACGACCGAACGATCCAGAATGGG	810
	TyrThrCysIleCysGlySerGlyGluAsnSerAlaValLeuHisTyrGlyHisAlaGlyAlaProAsnAspArgThrIleGlnAsnGly	270
	GATATGTGCTGTTCGACATGGGCGGTGAGTATTACTCTGTGCTTCGGACATCACCTGCTCCTTTCCCGCAACGGCAAGTTCACTGCA	900
	AspMetCysLeuPheAspMetGlyGlyGluTyrTyrSerValAlaSerAspIleThrCysSerPheProArgAsnGlyLysPheThrAla	300
	GACCAGAAGGCGTCTATGAGGCACTGCTGCTGAGCTCCCGTCCGTCATGGGTGCCATGAAGCCAGGTGACTGGTGGCTGACATGCAC	990
	AspGlnLysAlaValTyrGluAlaValLeuLeuSerSerArgAlaValMetGlyAlaMetLysProGlyAspTrpTrpProAspMetHis	330
	CGCTGGCTGACCGCATCCACCTGGAGGAGCTGGCCACATGGGCATCCTGAGCGGCAGCGTGGACGCCATGGTCCAGGCTCACCTGGGG	1080
	ArgLeuAlaAspArgIleHisLeuGluGluLeuAlaHisMetGlyIleLeuSerGlySerValAspAlaMetValGlnAlaHisLeuGly	360
	GCCGTGTTTATGCCTCACGGGCTTGGCCACTTCCTGGGCATTGACGTGCACGACGTGGGAGGCTACCCAGAGGGCGTGGAGCGCATCGAC	1170
	AlaValPheMetProHisGlyLeuGlyHisPheLeuGlyIleAspValHisAspValGlyGlyTyrProGluGlyValGluArgIleAsp	390
	GAGCCCGGCTCGGAGCCTGCCACTGCACGGCACCTGCAGCCAGGCATGGTGTCAACGTGGAGCCGGGCATCTACTTCATCGACCAU	1260
	GluProGlyLeuArgSerLeuArgThrAlaArgHisLeuGlnProGlyMetValLeuThrValGluProGlyIleTyrPheIleAspHis	420
	CTCCTGGATGAGGCCCTGGCGGACCCGGCCCGCCCTCTTCTTAACCGGAGGTCTGCAGCGCTTTCGCGGTTTTGGCGGGTCCGC	1350
	LeuLeuAspGluAlaLeuAlaAspProAlaArgAlaSerPheLeuAsnArgGluValLeuGlnArgPheArgGlyPheGlyGlyValArg	450
	ATCGAGGAGGACGTCGTGGTGATCGACAGCGGCATAGAGCTGCTGACCTGCGTGCCTCCGCACTGTGGAAGAGATTGAAGCATGCATGGCA	1440
	IleGluGluAspValValIleAspSerGlyIleGluLeuLeuThrCysValProArgThrValGluGluIleGluAlaCysMetAla	480
	GGCTGTGAAAGCCCTTACCCCTTCTCTGCCCCAAGTAGAGCCAGCCAGAAATCCCAGGCGACCTGGGGGCTGGCCTTGCAACCTC	1530
	GlyCysAspLysAlaPheThrProPheSerGlyProLys***	
	K8 493	
	TTTTCGTGATGGGACGCTGCTGGTCAGCACTCCAGTAGCGAGAGACGGCACCCAGAATCAGATCCCAGCTTCGGCATTTGATCAGACCA	1620
	AACAGTGCTGTTTCCCGGGGAGGAAACACTTTTTTAATTACCCTTTTCAGGCACCACTTTAATCTGTTTTATACCTTGCTTATTAAAT	1710

Şekil 2.6. Prolidaz cDNA'nın amino asit ve nükleotid dizisi (Endo ve Tanoue 1989).

Prolidazın nükleotid sırası da araştırmacılar tarafından saptanmıştır. Saptanan sıraya göre enzim amino asit olarak X - Ala -Ala - Ala sırası ile başlamaktadır (Endo ve Tanoue 1989). Gen lokalizasyonu ve amino asit sırasının tamamının saptanması yapı-fonksiyon ilişkisinin anlaşılması ve metabolik olarak önemli olan bu enzimin eksikliğinin sebep olduğu kalıtsal hastalığın temelini anlaşılması bakımından önem taşımaktadır. Prolidaz geni (PEPD) polimorfik allelleri içerir, bu aktiviteyi etkilemez ve nadir alleller prolidaz eksikliğine sebep olmaktadır (Phang et al 1995).

2.4. Prolidaz İzoenzimleri

İnsan prolidazı 2 izoenzimden oluşur ; prolidaz I ve II. Bunlar substrat spesifitesi ve bazı biyokimyasal özellikler yönünden birbirinden farklılık göstermektedir (Sugahara ve Ohno 1993).

Prolidazın bu iki izoenzimi ilk olarak 1985 yılında Butterworth ve Driestman tarafından iyon değişimi kromatografisi ile izole edilmiştir, daha sonra Myara ve arkadaşları 1987 ve 1989 yıllarında , Ohhashi ve arkadaşları ise 1990 yılında izoenzimleri izole etmeyi başarmışlardır (Myara et al 1994).

Prolidaz I tüm insan dokularında bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda, prolidaz I 'in tüm iminodipeptidlerle reaksiyona girmesine rağmen gly - pro dipeptidini tercih ettiği bulunmuştur. Cosson ve arkadaşları 1992 yılında prolidaz II 'nin gly - pro dipeptidine karşı düşük bir aktivite gösterdiğini ve bu izoenzimin plazmada bulunmadığını kaydederek, preinkübasyonun uzaması ile aktivitenin önemli ölçüde düştüğünü göstermişlerdir (Cosson ve

Myara 1992). Prolidaz II 'nin en yüksek aktiviteyi gly - pro yerine met - pro 'ya karşı gösterdiği saptanmıştır (Sugahara ve Ohno 1993).

İzoenzimlerin molekül ağırlıklarının saptanması için yapılan çalışmalarda prolidaz I'in molekül ağırlığının 112 kDa olduğu ve birbirini tamamlayan eşit molekül ağırlığında 2 subüniteden oluştuğu (56 kDa) bulunmuştur (Ohhashi ve Ohno 1990, Sugahara ve Ohno 1993). Prolidaz II 'nin ise molekül ağırlığının 185 kDa olduğu ve birbirine eş iki subüniteden (95 kDa) oluştuğu gözlenmiştir (Ohhashi ve Ohno 1990).

Prolidaz I için optimum şartların 1mM $MnCl_2$ konsantrasyonu 24 saat 37°C'da preinkübasyon olduğu bildirilmiştir. Ayrıca Mn^{+2} konsantrasyonunun yükseltilecek zamanın azaltılabileceği (25 mM $MnCl_2$ 45 dakika) ,ya da yüksek preinkübasyon ısısı ,düşük $MnCl_2$ konsantrasyonu ve düşük preinkübasyon zamanı kullanılabileceği kaydedilmiştir (Myara et al 1994).

1991 yılında Cosson ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda ; prolidaz I ve prolidaz II 'yi kromatografik olarak ayırdıktan sonra bu izoenzimlerin farklı doku dağılımları gösterdiğini bulmuşlardır (Cosson ve Myara 1992).

Tablo 2.1. İnsan prolidaz I ve II izoenzimlerinin doku dağılımları (%)
(Cosson ve Myara 1992)

	<u>Prolidaz I</u>	<u>Prolidaz II</u>
Karaciğer	53	47
Böbrek	62	38
İleum	53	47
Jejunum	46	54
Duodenum	42	58
Pankreas	22	78
Mide	42	58
Dalak	52	48
Beyin	36	64
Beyincik	44	56
Kalp	37	63
İskelet Kası	34	66
Eritrositler	51	49

Yine bu araştırmacılar karaciğer kaynaklı prolidaz II 'nin karaciğerde inhibe edildiğini saptamışlardır. Bu inhibisyona ise plazma proteinlerinin sebep olduğu kaydedilmiştir. Haptoglobin, α_2 - makroglobulin ve α_1 -antitripsinin prolidaz II'nin aktivitesinde etkili olmadığı, fakat saf albuminin 6 saatlik inkübasyondan sonra aktiviteyi ortadan kaldırdığı görülmüştür. Albuminin bu inhibitör etkisine dayanarak insan plazmasında prolidaz II 'nin aktivitesinin olmadığı açıklanmıştır (Cosson ve Myara 1992). Saf insan böbrek prolidaz I 'in agaroz jel elektroforezindeki görüldüğü bölgenin α_1 -globulin bölgesi olduğu bulunmuş, titrasyon

eğrisinden de isoelektrik noktanın 4,65 olduğu saptanmıştır. Bu nokta insan ve hayvan dokularındaki diğer prolidazlar için de geçerli olmaktadır. Doku homojenatlarının agaroz elektroforezinde α_1 ve α_2 globulin bölgesinde iki ayrı band gözlenmiştir. α_2 globulin bölgesindeki bandın prolidaz II ile ilgili olduğu substrat olarak phe-pro kullanılarak gösterilmiştir. Bu α_2 bandı plazmada saptanamamıştır, bu da vücut sıvılarında prolidaz II aktivitesinin olmadığını bir kez daha doğrulamıştır. Çeşitli insan dokularından alınan prolidaz I izoenziminin tavşan immünglobulinleri ile çapraz reaksiyon verdiği görülmüştür. Aynı immünglobulinler prolidaz II ile reaksiyon vermemiştir. Buna göre hepatik fibrozis ve prolidaz eksikliği olan hastaların dokuları ve plazmalarından prolidaz I araştırılmasında bir spesifik immünassay yöntem geliştirilebileceği düşünülmüştür (Myara et al 1994).

2.5. Prolidaz İnhibitörleri

1957 yılında yapılan bir çalışmada domuz böbrek prolidazı üzerinde çeşitli inhibitörler denenmiştir. Bu çalışmacılar enzimin aktivasyonu için gerekli olan Mn^{+2} iyonu yerine başka metal iyonlarının ilavesi ile inhibisyon gözlemişlerdir. Fe^{+2} , Co^{+2} , Ni^{+2} , Cu^{+2} , Zn^{+2} , Cd^{+2} , Ag^{+1} , Hg^{+2} , Pb^{+2} ve Pt^{+4} iyonlarının prolidazı inhibe ettiğini bulmuşlardır. Ortalama 0,001-0,0004M aralığındaki konsantrasyonlarda glutatyon kullanıldığında optimal stabilizasyon ve aktivite sağlandığı, ancak glutatyonun yüksek konsantrasyonunun inhibisyona sebep olduğu bulunmuştur. Aynı araştırmacılar iyodoasetamid ve p-kloromerküri benzoatın da enzimi inhibe ettiğini kaydetmişlerdir (Davis ve Smith 1957).

1988 yılında yapılan bir çalışmaya göre ise, Mg^{+2} ve Fe^{+2} metal iyonlarının enzimin aktivitesine önemli bir etkisi olmadığı bulunmuştur. Bundan başka Co^{+2} 'nin Leu-Pro dışındaki substratlara karşı prolidazı inhibe ettiği saptanmıştır. Cu^{+2} , Hg^{+2} , Cd^{+2} , Zn^{+2} , Pb^{+2} iyonlarının da enzimi önemli derecede inhibe ettiği gözlenmiştir (Oono ve Arata 1988).

Prolidazın substrat analogu olan asetilprolin, prolin ve trans-1,2 siklopentadikarboksilik asit tarafından kompetitif inhibisyonunda K_i 'nin pH'ya bağlı olarak izlediği yol araştırılmıştır. Bu araştırmanın sonucunda; enzimin fonksiyonel grubu ile substratın $pK_a:6.6$ 'da bağlandığı bununla birlikte bu maddelerle inhibisyonun farklı yollar izlediği saptanmıştır (Mock ve Green 1990).

2.6. Prolidaz Eksikliği

Prolidaz eksikliği ilk olarak 1968 yılında Goodman ve arkadaşları tarafından tanımlanmış olup, nadir görülen otozomal resesif metabolik bir bozukluktur (Kodama ve Ohhashi 1989, Cosson ve Myara 1992, Chanson ve Voigtlander 1989).

Prolidaz eksikliğin insidansı 1 milyon doğumda 1-2'dir (Phang et al 1995, Kodama ve Ohhashi 1989, Myara ve Myara 1984).

Hastaların en önemli klinik belirtileri kronik bacak ülseri, splenomegali, mental retardasyon olup fazla miktarda iminodipeptidüri görülmektedir (Kodama ve Mikasa 1988, Kodama ve Ohhashi 1989, Cosson ve Myara

1992, Sugahara ve Ohno 1993). Ayrıca sinüzit, otitis media'nın yanı sıra anemi ve gama-globulinlerin artması gibi hematolojik bozukluklara da rastlanmaktadır (Milligan ve Brown 1989, Chamson ve Voigtlander 1989).

Prolidaz eksikliğinde günlük 1-6 gr kadar prolinin dipeptid şeklinde kaybı olmaktadır. Enzim eksikliğinde diğer amino asitlerin günlük kayda değer bir kaybı görülmemektedir (Scriver 1978, Milligan ve Brown 1989). Bu sayılan belirtiler homozigotlarda görülürken, hastalık resesif olduğundan heterozigotlarda klinik anormallikler ve iminodipeptidüri de görülmemektedir. Bu kişilerde prolidaz seviyesi kontrollere göre yaklaşık % 50 daha düşük saptanmıştır (Phang et al 1995).

Kodama ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda, prolidaz eksikliği olan hastanın lökositlerindeki prolidaz I aktivitesinin kontrollerden çok düşük olduğunu, buna rağmen prolidaz II-aktivitesinin hemen hemen kontrollerle aynı olduğunu bulmuşlardır (Kodama ve Ohhashi 1989).

1988 yılında yapılan bir çalışmada ise; prolidaz eksikliği olan iki kız kardeşten elde edilen eritrositlerden prolidazın biyokimyasal özellikleri tanımlanmıştır. Bu çalışmada önce kontrol ve hastaların ebeveynlerindeki prolidazların substratlara karşı ilgisi şöyle sıralanmıştır;

Gly-Pro > Ala-Pro > Met-Pro > Phe-Pro > Leu-Pro > Val-Pro

Hastalardan alınan prolidazın substratları hidroliz etme sırası ise şöyle bulunmuştur;

Met-Pro > Leu-Pro > Ala-Pro > Phe-Pro > Val-Pro > Gly-Pro

Ayrıca kontrol, ebeveyn ve hastaların prolidazlarının Mn^{+2} 'li ve Mn^{+2} 'siz ortamdaki aktiviteleri karşılaştırılmıştır. Kontrol ve ebeveynlerin prolidazında Mn^{+2} 'li ortamdaki aktivite 5-10 kat fazla iken , hasta prolidazında Mn^{+2} 'li ortamda aktivite 10-12 kat fazla olarak bulunmuştur. Preinkübasyonun kontrol ve ebeveynlerin prolidaz aktivitesini artırdığı gözlenirken, hastalarda prolidaz aktivasyonunun preinkübasyon ile azaldığı görülmüştür (Kodama ve Mikasa 1988).

Tanoue ve arkadaşlarının (1990) yaptıkları bir çalışmada ise; prolidaz eksikliği olan iki ayrı hastanın fibroblastlarından sağlanan prolidazın tüm kodlama bölgesinin mRNA 'sı PCR tekniği ile incelenmiştir. Geliştirilen cDNA ürünlerinin nükleotid sıra analizi ile 12. exonda 826. pozisyonda adenin (A) yerine guanin'in (G) yerleştiği görülmüştür. Bunun sonucu 276. amino asit kalıntısında aspartik asit yerine asparagin'in girdiği tespit edilmiştir. DNA analizi ile de substitüsyonun homozigot olduğu açığa çıkarılmıştır . Bu birbiri ile ilişkisi olmayan iki hastanın da ailelerinin Orta Doğu kökenli olmaları bu mutasyonun özellikle bu bölgeden kaynaklandığını düşündürmektedir.

Aynı yıl yapılan bir çalışmada ise, prolidaz eksikliği olan bir hastanın; annesinin ve kontrollerin eritrositlerinden alınan prolidaz I ve II poliakrilamid jel elektroforezi ile izole edilmiştir. Dört değişik substrata karşı hasta, annesi ve kontrolden alınan prolidaz I ve II 'nin V_{max} ve K_m değerlerini saptamışlardır (Ohhashi ve Ohno 1990).

Tablo 2.2. Dört değişik substrat için, hasta, annesi ve kontrollerin V_{max} ve K_m değerleri (Ohhashi ve Ohno 1990)

	Gly-Pro		Ala-Pro		Phe-Pro		Met-Pro	
	I	II	I	II	I	II	I	II
V_{max} ($\ddot{U}$ /mg protein)								
Kontrol	22,21	-	11,53	1,81	5,78	0,93	4,82	3,60
Anne	6,02	-	3,37	1,87	1,46	0,90	1,48	3,70
Hasta	-	-	-	1,84	-	1,09	-	3,01
K_m (nmol /L)								
Kontrol	2,92	-	0,98	17,63	1,10	17,60	0,92	10,25
Anne	2,88	-	0,87	16,36	0,81	13,80	0,81	11,03
Hasta	-	-	-	14,58	-	18,97	-	11,43

1990 yılında yapılan bir başka çalışmada ise, polipeptid ve RNA fenotiplerinin klinik fenotiplerle ilişkisi araştırılmıştır. Northern blot analizi ile polipeptid pozitif hücrelerde mRNA 'nın varlığını , polipeptid negatif hücrelerde olmadığı gösterilmiştir. Böylece prolidaz eksikliğinde moleküler bir heterojenite olduğu düşünülmüştür. Polipeptid negatif hastalarda mental retardasyonun dışında, klinik semptomlarla biyokimyasal fenotipler arasında belirgin bir ilişki olmadığı bulunmuştur (Endo ve Tanoue 1990).

Chamson ve grubu prolidaz eksikliğinde en önemli değişikliğin kollajen yıkımının hızla artması olduğunu saptamışlardır. Bu olay gerçekte bağ

dokusu hastalığının değil, kollajen biyosentezinin azalan prolin havuzu tarafından kısıtlanmasından kaynaklanmaktadır. Ayrıca prolidaz eksikliğinin etkisinin araştırılmasında gly-pro 'nin önemli metabolik role sahip olduğu anlaşılmıştır (Chamson ve Voigtlander 1989).

Bu konuda son çalışma Zanaboni ve arkadaşları tarafından 1997'de yapılmıştır. Çalışmacılar prolidaz eksikliği olan hastalar ve kontrollerin kültüre edilmiş deri fibroblastlarındaki prolidaz aktivite sonuçlarını hem kolorimetrik hem de kapiller elektroforezini (CE) kullanarak saptamışlardır. Kapiller elektroforezi ile aldıkları sonuçlar, kolorimetrik sonuçlardan biraz düşük olarak bulunmuştur. Bunun da CE' nin yüksek spesifite ve sensitivitesinden kaynaklandığını ifade etmişlerdir (Zanaboni ve Viglio 1997).

2.6.1. Prolidaz Eksikliğinin Tanı ve Tedavisi

Tanı, eritrosit, lökosit ve deri fibroblast kültüründe prolidaz aktivite ölçümü ile yapılabilmektedir (Ohhashi ve Ohno 1990). Amniyotik hücre kültüründe aktivite ölçümleri ile prenatal dönemde erken teşhis olanağı da bulunmaktadır (Kodama ve Mikasa 1988, Milligan ve Brown 1989). Ayrıca hastanın idrarı ile atılan iminodipeptidlerin ölçümü de tanıda kullanılmaktadır (Endo ve Matsuda 1982, Sugahara ve Kodama 1991, Kodama et al 1990).

Bir grup araştırmacı tarafından tedavi için, bir hastaya eritrosit transfüzyonu yapılmıştır. Transfüzyondan sonra (800ml tam kan) periferik eritrositlerdeki prolidaz aktivitesi yaklaşık % 35 kadar artmış ve bu artış

zamanla azalmıştır (yarı ömrü 41 gün). Bu periyod sırasında idrardaki dipeptid düzeyi ölçülmüş, fakat anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir (Endo ve Matsuda 1982).

Bazı kaynaklarda C vitamini eksikliğinde olgun kollajen yapımının bozulduğu belirtilmektedir. Çünkü C vitamini olgunlaşmamış kollajendeki prolin ve lizin amino asitlerinin hidroksillenmesine yardımcı olmaktadır. Bu yüzden birçok kaynakta tedavide C vitamininin kullanıldığı kaydedilmektedir (Pasternak 1980).

Berardisca ve grubunun 1992 yılında yaptıkları çalışmada, prolidaz eksikliği olan hastanın ayağındaki ülserlerin, vitamin C, difenil hidantoin, $MnCl_2$ ya da % 5 glisin, % 5 prolin içeren pomadın lokal uygulanması tedavisine cevap vermediğini görmüşler, buna rağmen kan transfüzyonunun ülserlerin bazılarını küçültürken bazılarını da tamamen iyileştirdiğini kaydetmişlerdir. Fakat eritrosit transfüzyonundan 18 ay sonra cilt ülserleri yeniden tekrarlamıştır.

1993 yılında Bissonette ve arkadaşları tarafından, prolidaz eksikliği olan bir hastanın 24 saatlik idrarında fazla miktarda prolin (> 28 mmol/gün), glisin, glutamat ve aspartat saptanmıştır. Hastanın plazma Mn^{+2} seviyesi normalden yüksek (42,9 nmol/L normal: 6-16 nmol/L), vitamin C seviyesi normalden düşük bulunmuştur (16,6 μ mol /L normal: 30- 114 μ mol /ml). Tedavi için 6 ay oral vitamin C (3gr / gün) ve günlük lokal % 5 glisin % 5 prolin karışımının lezyonlara uygulaması hastanın cilt problemini çözememiştir .

Prolidaz eksikliği için etkin bir tedavi henüz tanımlanmamıştır, buna da hastalığın patogenezinin henüz açık olmaması neden olmaktadır. Prolinin diyetle ilavesi cilt belirtilerinde iyileşmeye sebep olmazken, Mn^{+2} ve askorbik asitin (C vitamini) diyetle ilavesi ise hem cilt lezyonlarında iyileşmeye, hem de iminodipeptidüri'de azalmaya sebep olmaktadır. Prolidaz aktivitesi içeren normal eritrositlerin hastalara transfüzyonu endojen prolidaz aktivitesini artırmakta, ancak cilt lezyonu ve iminodipeptidüriye etkisi olmamaktadır. Hastaya verilmeden önce donör eritrositlerdeki prolidaz aktivitesi 1 gece 37 °C 'da 1mM $MnCl_2$ 'de preinkübasyon ile 30 kat artırılınca, hastaya verildikten sonra enzim bu aktivitesini 2 hafta süreyle korumaktadır. Böyle hücrelerle sık transfüzyonlar yararlı olabilmektedir, fakat demir ve Mn^{+2} transfüzyonda toksik etki yapacağından bu olaydan kaçınılması gerekmektedir. Lezyonların tedavisinde cilt aşıları da başarısız olmuştur, fakat topikal günlük L-prolin ve glisin uygulaması ayak ülserlerinde etkili olmuştur (Phang et al 1995).

2.7. Diğer Hastalıklarda Prolidaz

1992 yılında yapılan bir çalışmada; kobaylarda 2-11 hafta süresince tekrarlayan peritoneal CCl_4 enjeksiyonu ile karaciğer fibrosizi indüklenmiştir. Serum prokollajen III peptid , prolidaz ve alanin amino transferaz düzeyleri indüksiyon periyodunda kontrol edilmiştir. Serum prokollajen III peptid ve prolidaz aktivitesi değişimleri ilk 6 haftadaki semikantitatif karaciğer seksiyonu değerleriyle korele olarak bulunmuş ve prolidaz aktivitesi tüm indüksiyon döneminde serum prokollajen III peptid miktarı ile doğru orantılı olarak saptanmıştır. Çalışmanın sonunda serum

prokollajen III peptid'in karaciğer fibrogenezinin değerli bir indikatörü olduğu, prolidaz aktivitesinin ise karaciğerdeki artmış kollajen metabolizmasının gösterilmesinde sınırlı rol oynadığı sonucuna varılmıştır (Jiang ve You 1992).

Alparslan ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarında; viral hepatit, kronik aktif hepatit ve sirozlu üç ayrı hasta grubunda serum prolidaz aktivitelerini, kontrol grubu değerleri ile karşılaştırmışlardır. Grupların serum prolidaz aktiviteleri şu şekilde bulunmuştur: kontrol grubunda; 1196 ± 36 U/l, viral hepatit grubunda; 1552 ± 71 U/l, kronik aktif hepatit grubunda; 2221 ± 101 U/l ve siroz grubunda 3164 ± 220 U/l. Bu sonuçlar, serum prolidaz aktivitesinin karaciğer hastalıklarının tanısında ve kronikleşmenin takibinde faydalı ve bağımsız bir değişken olabileceğini göstermiştir (Alparslan ve ark 1993).

Bir grup araştırmacı ise, fetal büyüme sırasında kollajen metabolizma hızının yüksek olduğunu düşünerek doğum öncesi ve doğum esnasında amniyotik sıvıda prolidaz I aktivitesini ölçmüşlerdir. Yapılan çalışmalar sonucunda, zamanında doğan bebeklerde doğum ağırlığı ve fetal akciğer olgunlaşmasının bir göstergesi olan lesitin ile prolidaz I aktivitesi arasında pozitif bir ilişki saptamışlardır. Ayrıca erken doğan bebeklerin amniyotik sıvılarında prolidaz I aktivitesi anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Bu veriler sonucunda prolidaz I aktivitesinin de fetal gelişimin göstergesi olabileceği anlaşılmıştır (Gürdol ve Genç 1995).

2.8. Prolidaz Aktivite Düzeyinin Ölçülmesinde Kullanılan Yöntemler

Bu konuda yapılan birçok çalışmada enzim aktivitesi ölçümünde modifiye edilmiş Chinard yöntemi kullanılmıştır (Kodama ve Mikasa 1988, Johnsen 1991, Dolenga ve Hechtman 1992).

Alparslan ve arkadaşları 1993 yılında viral hepatit, kronik aktif hepatit ve sirozlu hastaların serum prolidaz aktivitesini Chinard metoduyla ölçmüşlerdir. Bu hastaların serum prolidaz aktiviteleri bu metodla ölçülmüş ve değerleri kontrol grubundan anlamlı derecede farklı bulunmuştur .

Radzicka ve grubu ise prolidaz inhibitörleri ile ilgili yaptıkları çalışmada, pH:6'da K⁺-MES (4-morfolino etanosülfirik asitin monopotasyum tuzu) tamponunda 222nm'de Gly-Pro dipeptidinin kromofor grubunun kaybolması temeline dayanan devamlı spektrofotometrik bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntemi Mock ve arkadaşları da, N-açil prolinin prolidaz ile parçalanmasındaki pH'nın rolünü araştırdıkları çalışmada kullanmışlardır (Mock et al 1990, Radzicka ve Wolfenden 1991).

1989 yılında yapılan bir çalışmada ise, prolidaz eksikliğinin moleküler analizini yaptıkları çalışmada prolidaz aktivitesini fare monoklonal IgG'leri ile hazırlanmış agaroz kullanılarak immün presipitasyon yöntemi ile saptamışlardır (Endo ve Tanoue 1989).

Son yıllarda yapılan bir başka çalışmada, deri fibroblast kültürü ile elde edilen prolidazın aktivitesi kapiller elektroforez ile saptanmıştır. Ayrıca sonuçlar kolorimetrik bir yöntem olan Chinard ile de tekrarlanmıştır.

Kapiller elektroforezinin sensitivite ve spesifitesinin çok daha yüksek olduğu sonucuna varılmıştır (Zanaboni ve Viglio 1997).

En güvenilir metodlar substratın kaybolmasını ve ürünün oluşumunu anında ölçen metotlardır. Fakat Chinard reaksiyonu da, serbest prolin oluşumunu ölçen etkin bir metoddur (Phang et al 1995).



BÖLÜM 3

GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.Gereçler

3.1.1.Kullanılan Aletler

Isıtıcı manyetik karıştırıcı	IKA-RH
Santrifüj	Hermle Z-320
Vorteks	IKA-VF-2
Otomatik pipetler	Socorex
Visible spektrofotometre	Spectronic 20D
Hassas terazi	Sartorius
Su banyosu	Nüve BM 402
Derin dondurucu (-20 °C)	Arçelik
pH metre	Hanna

3.1.2.Kullanılan Kimyasal Maddeler

<u>Madde Adı</u>	<u>Formülü</u>	<u>Firma ve Katalog no</u>
Prolin	$C_5H_9NO_2$	Sigma P-0380
Glisil-Prolin	$C_7H_{12}N_2O_3$	Sigma G-3002
Alanil-Prolin	$C_8H_{14}N_2O_3$	Sigma A-3253
Glasiyel asetik asit	CH_3COOH	Merck 541
Ortofosforik asit	H_3PO_4	Merck 564

Ninhidrin	$C_9H_6O_4$	Merck 6762
Mangan klorür (II)hidrat	$MnCl_2 \cdot 2H_2O$	Merck 5917
Trizma HCl	$C_4H_{11}NO_3HCl$	Sigma T-3253
Triklorasetik asit	$C_2HCl_3O_2$	Fluka 91232
Prolidaz (Porcine Kidney)	100 ünite 2.4 mg	Sigma P-6675
Demir(II) klorür	$FeCl_2$	Carlo Erba 451575
Çinko asetat (II)hidrat	$ZnC_4H_6O_4 \cdot 2H_2O$	Fluka 96458
Civa nitrat (II)hidrat	$Hg_2N_2O_6 \cdot 2H_2O$	Fluka 83380
Magnezyum klorür (VI) hidrat	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	Riedel
Bakır (II)sülfat	$CuSO_4$	Merck 543
Stronsiyum klorür (VI) hidrat	$SrCl_2 \cdot 6H_2O$	Sigma S0390
EDTA (Titrplex III)	$C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$	Merck 8421
İyodoasetamid	C_4H_4INO	Fluka 57670
Glutasyon	$C_{10}H_{17}N_3O_6S$	Fluka 49750
p-Kloromerküribenzoik asit	$4-(ClHg)C_6H_4COOH$	Merck 821996

3.2. YÖNTEM

3.2.1.Örneklerin Hazırlanması

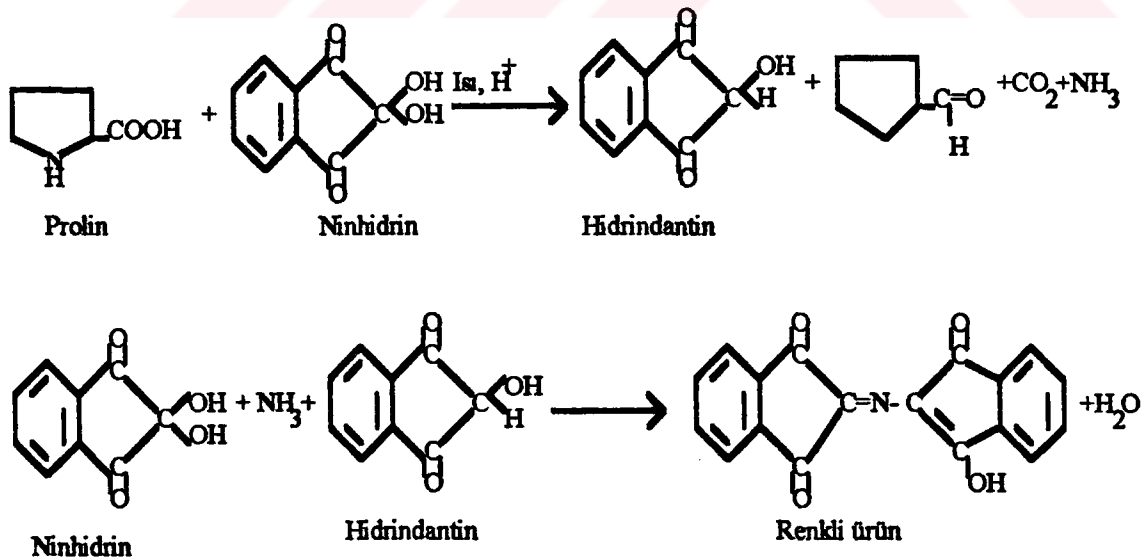
Serum : Çalışmada kullanılan serum örnekleri, Gaziantep Kızılay Kan Merkezine gelen 30 sağlıklı bireyin serumlarından oluşturulan havuzdan alındı. Serum prolidaz aktivite düzeyi ölçülene kadar -20 °C'da saklandı.

Domuz böbrek prolidazı: Elimizde saf enzim kaynağı olarak bulunan 1mg liyofilize domuz böbrek prolidazı, 10 ml distile suda çözülüp, küçük porsiyonlara bölünerek , analiz edilinceye kadar -20 °C'da saklandı.

3.2.2. Prolidaz Aktivitesi Ölçümü Yöntemi (Chinard)

İLKE: Substrat olarak glisil-prolin kullanılarak enzim aracılığı ile oluşan prolinin asidik ortamda ısı etkisiyle ninhidrin ile renkli bir bileşik (pembe) oluşturma ilkesine dayanarak serum prolidaz düzeyi ölçülür.

Rengin şiddeti prolin konsantrasyonuna bağlıdır ve spektrofotometrik olarak ölçülür.



Şekil 3.1.Ninhidrin reaksiyonu (Silverman et al 1986, Lehninger et al 1993)

3.2.2.1.AYIRAÇLAR

a-) Prolin standartı (1mmol/l)

Prolin	0,012gr
Distile su	100ml

Prolin bir miktar distile suda çözölüp son hacım 100 ml' ye tamamlandı.Bu şekilde hazırlanan stok çözelti küçük porsiyonlara ayrılıp -20°C'da saklandı. Çalışma solüsyonu olan 0,15 mmol/l , günlük standart olarak bu stokdan hazırlandı.

b-) Ninhidrin çözeltisi

1.)% 85'lik orto fosforik asitten 16,28 ml alınıp 40 ml'ye distile su ile tamamlanıp 6 molar orto fosforik asit çözeltisi hazırlandı.

2.) 6 hacım glasiyel asetik asit, 4 hacım 6 M'lık orto fosforik asit solüsyonu ile karıştırıldı.

3.) 2,5 gr ninhidrin 2 nolu çözelti içinde manyetik karıştırıcı ve ısı yardımıyla çözöldü. Bu çözelti +4°C'de uzun süre dayanıklıdır.

c-) Substrat çözeltisi : (Glisil-Prolin : 100 mmol/l)

Glisil-Prolin dipeptidi	0,172 gr
Distile su	10 ml

Substrat bir miktar distile suda çözölüp pH:8'e ayarlandı ve son hacım 10 ml'ye tamamlandı.Günlük olarak hazırlandı.

d-) Mangan (II) klorür ($\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 5mmol/l)

Mangan II klorür	0,2 gr
Distile su	250 ml

0,2gr mangan (II) klorür bir miktar distile suda çözülüp son hacim 250ml'ye tamamlandı. Bu çözelti uzun süre + 4°C'de dayanıklıdır.

e-)Tampon: Trizma HCl [Tris (hidroksimetil)- aminometan hidroklorür] :
(100 mmol/l pH:8)

Tampon	7,88gr
Distile su	500 ml

Tampon bir miktar suda çözülüp, pH ayarı yapıldı ve son hacim 500ml'ye tamamlandı.

f-)Triklorasetik asit : % 20'lik

TCA	20gr
Distile su	100ml

20 gr triklorasetik asit bir miktar distile suda çözülüp, son hacim 100ml'ye tamamlandı. Çözelti +4°C'da saklandı.

3.2.2.2. İşlem

İnsan serum ve domuz böbrek prolidaz aktivitesini saptamak için, literatürdeki insan eritrosit ve serum prolidaz aktivitesini ölçmede kullanılan yöntem modifiye edildi. Eritrosit prolidazı aktivite ölçümünde kullanılan işlemler aşağıda anlatıldı (Erbağcı ve Özdemir 1996, Alparslan ve ark 1993).

a-) İlk olarak 50µl serum, 9.95ml 2.5mmol/l $MnCl_2$ iyice karıştırılıp 2 saat 37 °C su banyosunda preinkübe edildi.

Not: İnsan serumundaki prolidaz aktivitesi eritrosit prolidaz aktivitesinden çok düşük olduğundan (yaklaşık % 6'sı) bu oran değiştirildi. Yapılan bir çok deney sonucu serum 1/40 oranında (tampon + Mn^{+2}) sulandırıldı. Daha önce yapılan serum prolidaz deneylerindeki 24 saat olan preinkübasyon zamanı ise 2 saate düşürüldü.

b-) İkinci basamakta her örnek için 2 ayrı tüp alındı.

Ayrıraçlar	1. tüp (0 zaman)	2.tüp (İnkübasyon)
-----	-----	-----
100 mM tampon (µl)	400	400
100 mM substrat (µl)	400	400
Distile su (µl)	100	100
preinkübe edilmiş örnek (µl)	100	100

Not: İnsan eritrosit prolidaz aktivite ölçümünde; inkübasyon karışımında substrat final konsantrasyonu 40 mmol/l olmaktadır. Bizim yaptığımız serum prolidaz deneylerinde optimum aktivite, 30 mmol/l, domuz böbrek prolidaz deneylerinde 40 mmol/l substrat konsantrasyonunda alındı. Bu yüzden 100 mmol/l substratdan serum prolidaz deneylerinde 300µl, domuz böbrek prolidaz deneylerinde 400µl kullanıldı.

İnkübasyon tüplerinin ağzı parafilmle kapatılıp, vorteks ile karıştırıldı ve 30 dakika 37 °C'da su banyosunda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda tüplere 500µl TCA ilave edilerek reaksiyon durduruldu. Sıfır zaman tüplerine ise aynı hacimde preinkübe edilmiş örnek eklenir eklenmez 500µl TCA ilave edilip reaksiyon durduruldu. Daha sonra sıfır zaman ve inkübasyon tüplerinin hepsi 5 dakika 2000 rpm'de santrifüj edildi. Oluşan süpernatant spektrofotometrik prolin ölçümü için kullanıldı.

c-) Prolinin spektrofotometrik ölçümü için; (Chinard)

Her örnek için ağzı kapaklı 4 tüp alındı.

<u>Ayrıçlar</u>	<u>Kör</u>	<u>Standart</u>	<u>0 zaman</u>	<u>İnkübasyon</u>
Glasiyel asetik asit (ml)	2.5	2.5	2.5	2.5
Süpernatant(ml)	-	-	1	1
Standart(ml)	-	1	-	-
Distile su (ml)	1	-	-	-
Ninhidrin (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5

Bu dört tüp ağzı kapatılarak vortekslenip 20 dakika kaynar su banyosunda tutuldu. Bu zaman sonunda tüpler buzlu su banyosunda soğutularak absorbanları spektrofotometrede köre karşı 515 nm'de ölçüldü.

3.2.2.3.Hesap

$$\text{Prolidaz aktivite düzeyi} : \frac{(A-B) \times [S] \times \text{Faktör}}{S}$$

A:İnkübasyon tüpü absorban değeri

B:Sıfır zaman tüpü absorban değeri

[S]:Standart konsantrasyonu (mmol/l)

S:Standart absorban değeri

Faktör: $\frac{\text{Preink. ortamındaki sulandırma} \times \text{İnk. ortamındaki sulandırma}}{\text{İnkübasyon zamanı}}$

F: $\frac{40 \times 15}{30'}$

Prolidaz aktivite düzeyi: $\frac{(A-B) \times [S] \times \text{Faktör}}{S}$:1 litrede 1 dakikada oluşan mmol prolin miktarı

Prolidaz aktivite düzeyi: $\frac{(A-B) \times [S] \times \text{Faktör} \times 60}{S}$:1 litrede 1 saatte oluşan mmol prolin miktarı

Serumda aktivite tanımı : 1milimol substratı, 37°C ve 1 saatte değişikliğe uğratan enzim miktarı olarak yapılmıştır. Birim Ü/l olarak tanımlanmıştır.

3.3. Planlanan Çalışma Şeması

1. İnsan serum prolidazının stabilitesinin saptanması,
2. Öncelikle serum prolidaz aktivitesini ölçebilmek için önceden çeşitli prolidaz deneylerinde kullanılan yöntemin optimizasyonunun yapılması, bunun için preinkübasyon zamanı ve oranı, tampon konsantrasyonu ve pH'sı, Mn^{+2} konsantrasyonu, substrat konsantrasyonunu belirli aralıklarda değiştirerek laboratuvar şartlarımıza uygun, anlamlı değerler alabileceğimiz analiz koşullarının oluşturulması ,
3. Mn^{+2} iyonu dışında enzim aktivatörü olabileceği düşünülen bazı +2 değerlikli metal iyonlarının her iki enzime etkisinin incelenmesi,
4. Hem insan serum prolidazının hem de domuz böbrek prolidazının iki ayrı dipeptid (glisil-prolin ve alanil-prolin) için Michaelis Menten eğrileri çizilip K_m ve V_{max} değerlerinin saptanması,
5. EDTA , İAA, p-CMBA ve glutatyon gibi aktivatör ve inhibitör maddelere karşı insan serum ve domuz böbrek prolidazının davranışları incelenip sonuçların karşılaştırılması amaçlandı.

BÖLÜM 4

BULGULAR

4.1. Stabilité

Serum prolidaz stabilitesini saptamak için yaptığımız çalışmalarda, aktivitenin -8 °C ve -20 °C'da bir yıl süreyle değişmediği bulundu. +4°C'de saklanan serumlarda ise bir gün sonra aktivitenin değişmediği, ancak ikinci günde % 10 kadar bir azalma olduğu tespit edildi. Ayrıca serum örneklerinin -8 °C ve -20 °C'da 2. kez dondurulup çözülmesi ile aktivite kaybı olmadığı görüldü. Bunun yanı sıra aynı kişilerin serum ve plazmalarındaki prolidaz aktivite değerlerinin farklı olmadığı saptandı.

4.2. Analiz Koşullarının Saptanması

Analiz koşullarının saptanmasında daha önce yapılan serum prolidaz ve eritrosit prolidaz çalışmaları temel alındı. Önceki serum prolidaz çalışmalarında, serum tampon ile 1/6 oranında sulandırılarak, 24 saat 37°C'da preinkübe edilmiştir (Alparslan ve ark. 1993, Myara ve Myara 1984). Eritrosit prolidaz aktivitesi ölçülürken ise örnek 1/200 oranında final 2.5mmol/l konsantrasyonunda $MnCl_2$ çözeltisi ile sulandırıldıktan sonra 2 saat 37°C'da preinkübe edilmiştir (Erbağcı ve Özdemir 1996). Bu çalışmada ilk olarak preinkübasyon koşulları oluşturuldu. Preinkübasyon zamanı saptanırken 1, 2, 4 ve 6 saat olmak üzere dört değişik zamanda çalışmalar yapıldı, en uygun sonucun 2 saatte alındığı görüldü. Preinkübasyon ısısının saptanmasında ise 37°C, 45°C ve 55°C'da denemeler

yapıldı ve 45°C ile 55°C'da hiç aktivite alınmadı. Bu verilerin ışığı altında en uygun koşullar şöyle saptandı:

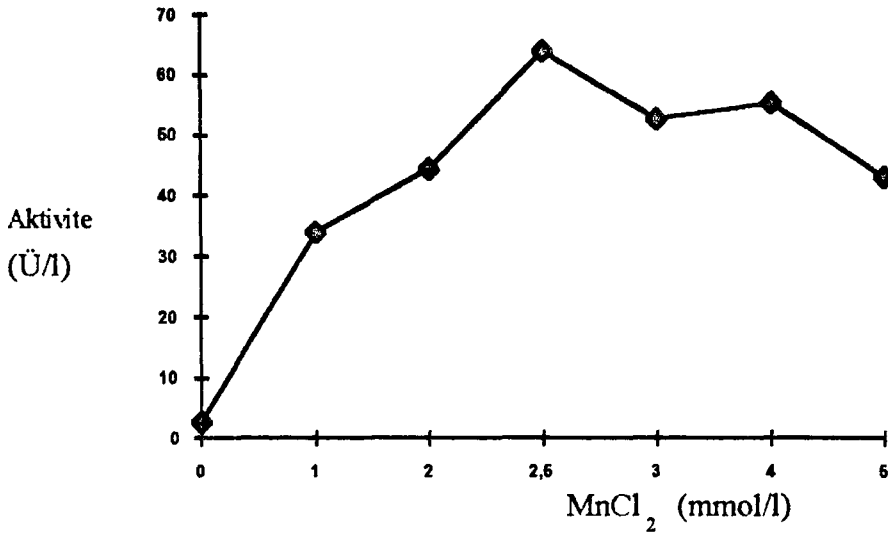
100µl serum, 1.9ml tampon + 2ml 2.5mmol/l $MnCl_2$ çözeltisi ile 1/40 oranında sulandırılarak 2 saat 37°C' da preinkübe edildi.

İkinci aşamada ise substrat konsantrasyonu düzenlendi. Daha önceki serum prolidaz deneylerinde 47mmol/l, eritrosit prolidaz çalışmasında ise 40mmol/l substrat kullanılmıştır. Bizim değişik substrat konsantrasyonları ile yaptığımız çalışmalarda ise, en yüksek aktivite 30mmol/l substrat ile alındı. Bu yüzden bütün deneylerimizde 30mmol/l substrat kullanıldı. Diğer bütün aşamalarda eritrosit prolidaz deney koşulları uygulandı.

4.3. Prolidaz Aktivitesi Üzerine Mn^{+2} 'nin Etkisi

4.3.1. Serum Prolidazı

Enzim aktivitesi üzerine Mn^{+2} 'nin etkisini saptamak için preinkübasyon ortamına değişik konsantrasyonlarda Mn^{+2} çözeltisi ilave edildi. Sonuçlar şekil 4.1.'de verildi.

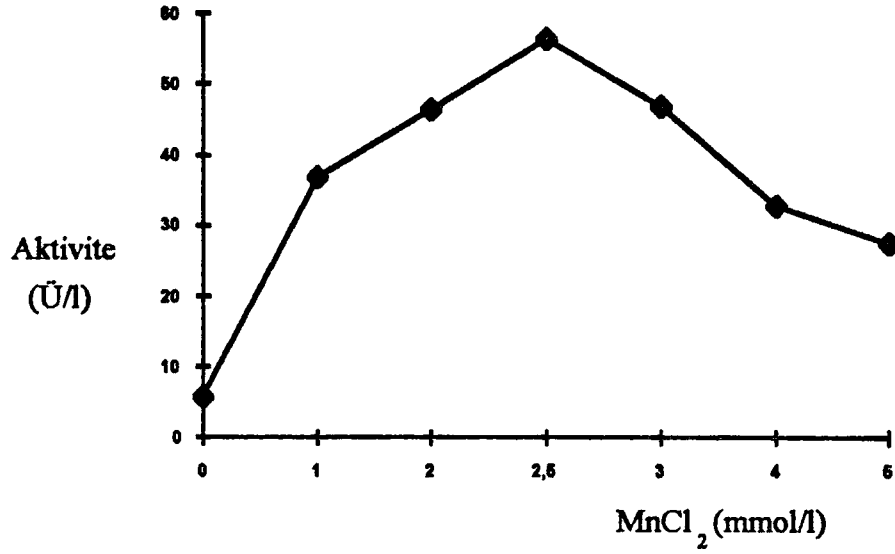


Şekil 4.1. İnsan serum prolidaz aktivitesi üzerine Mn^{+2} 'nin etkisi

Mn^{+2} 'nin prolidaz aktivitesini 23 kez artırdığı gözlemlendi. Mn^{+2} 'nin olmadığı ortamda enzim aktivitesi 2,7 Ü/l olarak saptandı. En yüksek aktivite ise final konsantrasyonu 2.5 mmol /l Mn^{+2} kullanıldığı zaman alındı.

4.3.2. Domuz Böbrek Prolidazı

Aynı şekilde preinkübasyon ortamına değişik konsantrasyonlarda Mn^{+2} ilave edilerek, Mn^{+2} 'nin domuz böbrek prolidaz aktivitesine etkisi incelendi.



Şekil.4.2. Domuz böbrek pepsin aktivitesi üzerine Mn^{+2} 'nin etkisi

Mn^{+2} 'nin aktiviteyi 9.5 kez artırdığı bulundu. 2.5 mmol/l Mn^{+2} konsantrasyonu (final) kullanıldığında en iyi aktivite gözlemlendi. Yapılan deneylerde de 2.5 mmol / l Mn^{+2} kullanıldı.

4.4. Pepsin Aktivitesi Üzerine Bazı Metal İyonlarının Etkisi

Mn^{+2} yerine +2 değerlikli bazı metal iyonları , aynı konsantrasyonda (final 2,5 mmol/l) preinkübasyon ortamına ilave edildi. Alınan sonuçlar tablo 4.1' de verildi.

Tablo 4.1 Bazı metal iyonlarının insan serum ve domuz böbrek prolidaz aktivitesi üzerine etkisi.

Metal İyonları (2,5 mmol/l)	Serum Prolidaz Aktivitesi (%)	Domuz Böbrek Prolidaz Aktivitesi (%)
Mn ⁺²	100	100
Fe ⁺²	-	23
Zn ⁺²	-	13
Hg ⁺²	-	26
Mg ⁺²	-	33
Cu ⁺²	-	20
Sr ⁺²	-	-

Mn⁺² dışındaki metal iyonların hiçbiri ile serum prolidazında aktivite saptanmadı. Ancak domuz böbrek prolidazında, stronsiyum dışındaki metallerle Mn⁺² ile elde edilenin % 13 ile % 33 arasında değişen aktivite elde edildi.

4.5. Metal İyonlarının Mn⁺² ile Birlikte Kullanılarak Enzim Aktivitesindeki Değişikliklerin İncelenmesi

Preinkübasyon ortamına Mn⁺² ile aynı konsantrasyonda (final 2,5mmol/l), değişik metal iyonları Mn⁺² ile birlikte ilave edildi. Her iki enzimde de farklı sonuçlar alındı. Sonuçlar tablo 4.2'de verildi.

Tablo 4.2. İnsan serum ve domuz böbrek prolidazının aktivitesine Mn^{+2} ile birlikte metal iyonlarının etkisi

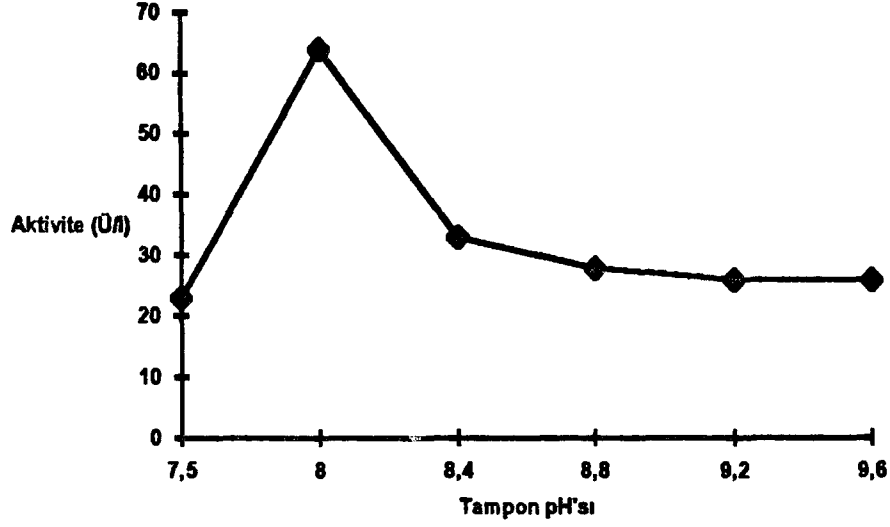
Metal İyonları	Serum Prolidaz Aktivitesi (%)	Domuz Böbrek Prolidaz Aktivitesi (%)
Mn^{+2}	100	100
$Mn^{+2} + Fe^{+2}$	53	60
$Mn^{+2} + Zn^{+2}$	-	25
$Mn^{+2} + Hg^{+2}$	-	29
$Mn^{+2} + Mg^{+2}$	68	86
$Mn^{+2} + Cu^{+2}$	41	34
$Mn^{+2} + Sr^{+2}$	98	58

Tek başlarına kullanıldığında insan serum prolidazı üzerinde hiç aktivatör etki göstermeyen bazı metallerin, Mn^{+2} ile birlikte ilave edildiğinde enzimi değişik oranlarda etkilediği görüldü. Domuz böbrek prolidazında ise, metal iyonlarının Mn^{+2} ile birlikte enzimi, tek başlarına olduklarından daha fazla aktive ettiği görüldü.

4.6. Tampon pH'sının Enzim Aktivitesine Etkisi

4.6.1. Serum Prolidazı

Trizma HCl tamponunun değişik pH' da (7,5-9,6) enzim aktivitesi üzerine etkisi araştırıldı. Elde edilen sonuçlar şekil 4.3.'de verildi .

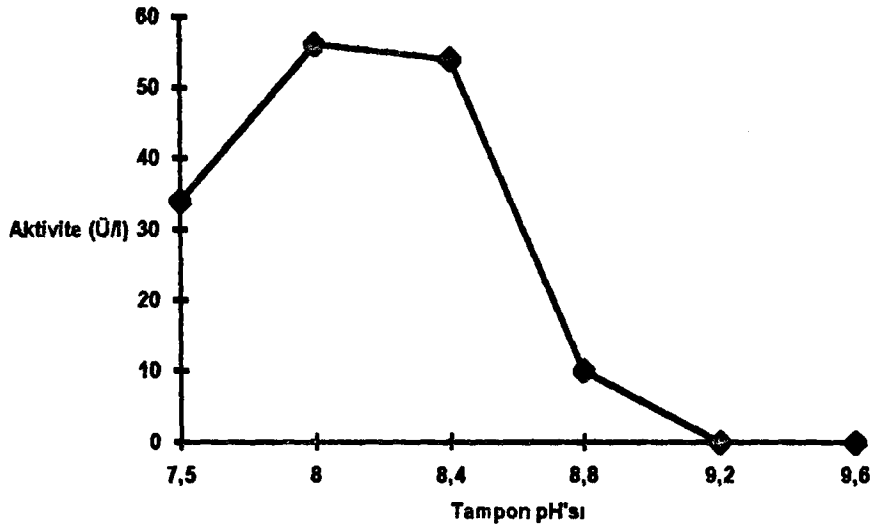


Şekil.4.3.Serum prolidaz aktivitesine tampon pH'sının etkisi

En yüksek aktivite pH : 8'de elde edildi. Bundan dolayı deneylerde pH: 8 olan tampon kullanıldı.

4.6.2. Domuz Böbrek Prolidazı

Trizma HCl tamponu pH'sının domuz böbrek prolidaz aktivitesi üzerine etkisini araştırmak için de pH:7,5-9,6 arasında değişen tamponlar kullanıldı. Deney sonuçları şekil 4.4.'de verildi.

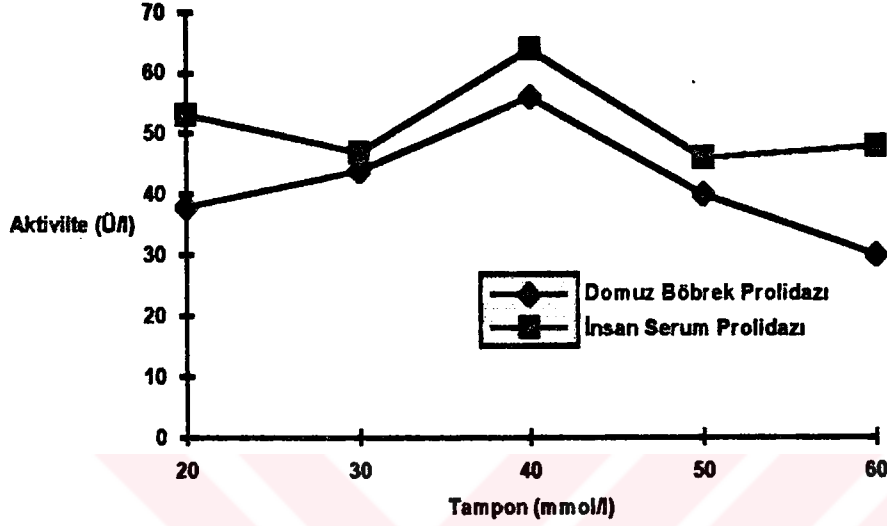


Şekil 4.4. Domuz böbrek prolidazı aktivitesine tampon pH'sının etkisi

Domuz böbrek prolidazında da en yüksek aktivite pH: 8'de alındı. Yalnız insan serum prolidazından farklı olarak pH: 9.2 ve 9.6'da aktivite alınamadı.

4.7. Tampon Konsantrasyonunun Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisi

20-60 mmol/l (final) aralığında değişen konsantrasyonlarda Trizma HCl kullanılarak tampon konsantrasyonunun aktiviteye etkisi araştırıldı. Her iki prolidazın da sonuçları şekil 4.5.'de gösterildi.



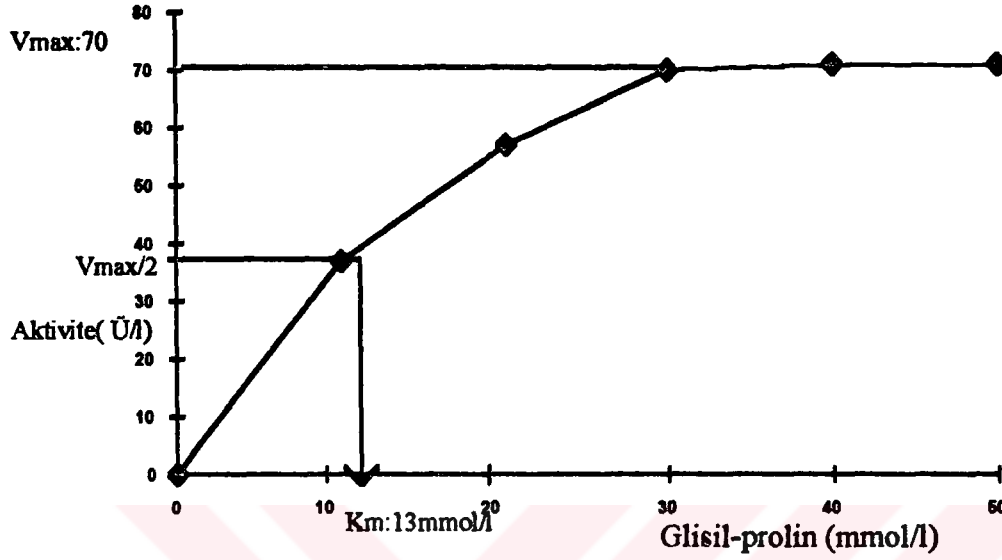
Şekil 4.5. Değişik tampon konsantrasyonlarının serum prolidazı ve domuz böbrek prolidazı aktivitesi üzerine etkisi.

En yüksek aktivitenin (final) 40 mmol/l tampon ile alındığı gözlemlendi. Bu yüzden bütün deneylerde 40 mmol/l'lik tampon kullanıldı.

4.8. Serum Prolidazının Michaelis Menten Eğrisi

4.8.1. Glisil-Prolin Dipeptidi için

Final 10-50 mmol/l konsantrasyon aralığında glisil-prolin dipeptidi kullanılarak serumdaki prolidazın aktivitesi ölçüldü. Bu sonuçlara göre elde ettiğimiz Michaelis Menten eğrisi şekil 4.6.'da verildi.

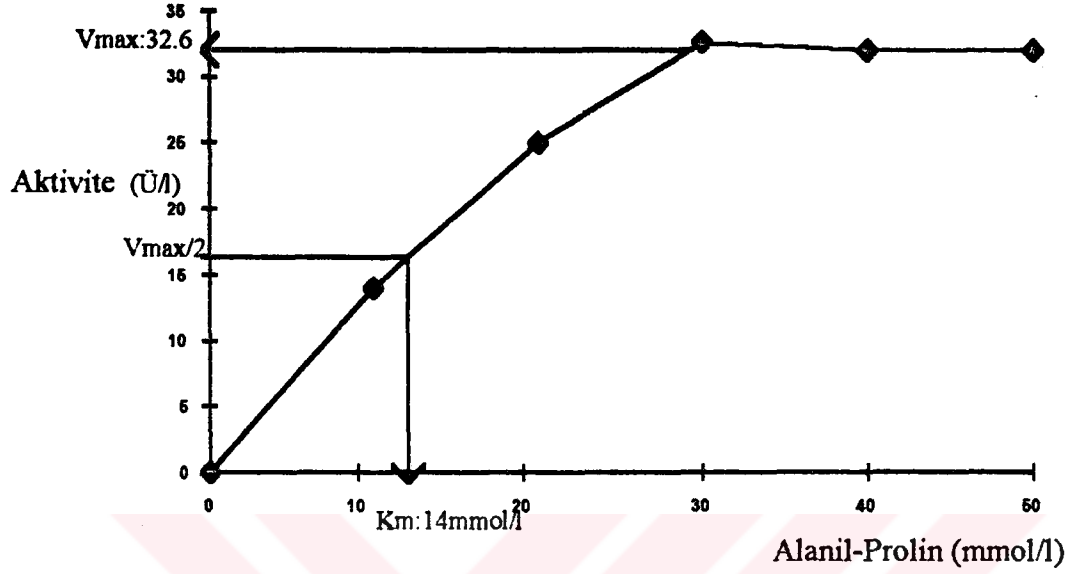


Şekil 4.6. Serum prolidazının glisil-prolin substratı kullanılarak elde edilen Michaelis Menten eğrisi

Serum prolidazının glisil-prolin dipeptidi kullanılarak çizilen grafikten Vmax: 70 mmolprolin/l saat , Km: 13 mmol/l olarak bulundu.

4.8.2. Alanil-Prolin Dipeptidi için

Enzim miktarı sabit tutularak, alanil-prolin dipeptidinin final 10-50mmol/l konsantrasyondaki çözeltileri kullanılarak serum prolidazının aktivitesi ölçüldü. Serum prolidazının alanil-prolin için elde edilen Michaelis Menten eğrisi şekil 4.7.'de verildi.



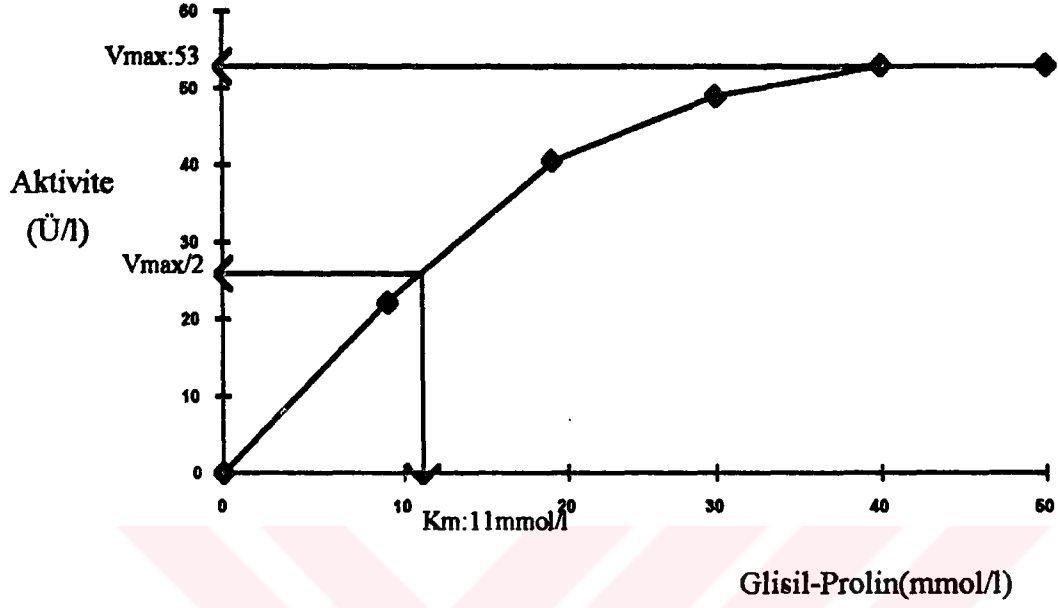
Şekil 4.7. Serum prolidazının alanil-prolin kullanılarak çizilen Michaelis Menten eğrisi

Çizilen grafikte Vmax: 32,6 mmolpro/lsaat, Km: 14mmol/l olarak bulundu.

4.9. Domuz Böbrek Prolidazının Michaelis Menten Eğrisi

4.9.1. Glisil- Prolin Dipeptidi için

Substrat olarak glisil-prolinin değişik konsantrasyonları kullanılarak aktiviteler ölçüldü. Sonuçlar şekil 4.8.'da verildi.

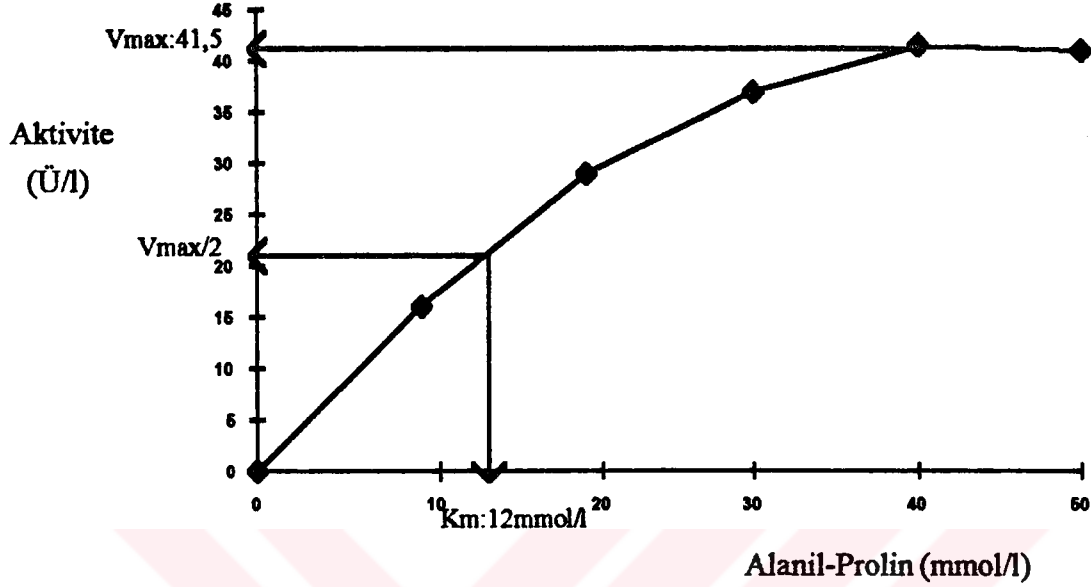


Şekil 4.8. Domuz böbrek prolidazının glisil-prolin kullanılarak elde edilen Michaelis Menten eğrisi

Vmax: 53 mmol/l saat, Km: 11 mmol/l olarak tespit edildi.

4.9.2. Alanil-Prolin Dipeptidi için

Domuz böbrek prolidazı için Michaelis-Menten eğrisi alanil-prolin dipeptidi kullanılarak da çizildi. Değişik substrat konsantrasyonlarına karşılık alınan aktivite değerleri şekil 4.9.'da verildi.



Şekil 4.9. Domuz böbrek prolidazının alanil-prolin dipeptidi ile çizilen Michaelis Menten eğrisi

Alanil-prolin substratı için V_{max} : 41,5 mmolpro/l saat, K_m :12 mmol/l olarak bulundu.

4.10. EDTA'nın Prolidaz Enzim Aktivitesine Etkisi

EDTA (etilendiamintetraasetik asit) iki değerlikli katyonlarla şelat bağı yapan bir bileşiktir. Prolidaz da Mn^{+2} gerektiren bir metalloenzimdir. Bu çalışmada preinkübasyon ve inkübasyon aşamalarında değişik konsantrasyonlarda EDTA ilave edilerek enzim aktivitesine etkisi incelendi. İnsan serum ve domuz böbrek prolidazına preinkübasyon aşamalarında EDTA eklenmesi ile aldığımız aktivite sonuçları tablo 4.3.'da verildi.

Tablo 4.3. Preinkübasyon aşamasında EDTA ilavesinin prolidaz aktivitesi üzerine etkisi

Final EDTA Kon.	Serum Prolidazı	Domuz Böbrek Prolidazı
(mmol/l)	% Aktivite	% Aktivite
0	100.0	100.0
1	61.2	68.0
2	58.0	16.8
2.5	39.0	-
3	-	-
4	-	-
5	-	-

Her iki enzimde de EDTA konsantrasyonu artıkça inhibisyonun arttığı görüldü. Aynı konsantrasyonlardaki EDTA bu kez inkübasyon aşamasında reaksiyon ortamına ilave edilerek aktivitedeki değişiklik kaydedildi. Sonuçlar tablo 4.4.'de verildi.

Tablo 4.4. İnkübasyon aşamasında EDTA ilavesinin prolidaz aktivitesi üzerine etkisi

Final EDTA Kon. (mmol/l)	Serum Prolidazı % Aktivite	Domuz Böbrek Prolidazı % Aktivite
0	100.0	100.0
1	80.8	69.8
2	65.5	65.0
2.5	54.0	62.3
3	53.2	62.6
4	50.0	60.3
5	48.3	60.0

İnkübasyon aşamasında EDTA ilavesinin inhibisyona sebep olduğu fakat preinkübasyona göre bu inhibisyonun daha az olduğu saptandı.

4.11. İAA'in Prolidaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Bu deneyimizde de İAA'ın final konsantrasyonu 10-50mmol/l olan çözeltileri hem preinkübasyon hem de inkübasyon sırasında reaksiyon ortamına ilave edilerek enzim aktivitesi ölçüldü. Preinkübasyon sonuçları tablo 4.5.'de verildi.

Tablo 4.5. Preinkübasyon aşamasında eklenen İAA'nın serum prolidazı ve domuz böbrek prolidaz aktivitesi üzerine etkisi

Final İAA Kon.	Serum Prolidazı	Domuz Böbrek Prolidazı
(mmol/l)	% Aktivite	% Aktivite
0	100.0	100
10	40.8	-
20	37.0	-
30	30.0	-
40	5.2	-
50	-	-

İnsan serum prolidazında İAA konsantrasyonu arttıkça aktivite azalırken, domuz böbrek prolidazında hiç aktivite alınamadı.

Aynı konsantrasyondaki İAA çözeltileri bir kez de inkübasyon ortamına eklenerek enzim aktivitesindeki değişiklikler saptandı. Sonuçlar tablo 4.6.'da verildi.

Tablo 4.6. İnkübasyon aşamasında eklenen İAA'nın enzim aktivitesine etkisi

Final İAA Kon.	Serum Prolidazı	Domuz Böbrek Prolidazı
(mmol/l)	% Aktivite	% Aktivite
0	100.0	100
10	60.0	87
20	44.8	71
30	36.5	60
40	36.5	-
50	33.8	-

İAA konsantrasyonu artıkça her iki prolidazın da aktivitesinde değişik oranlarda azalmalar oldu.

4.12. p-CMBA'in Prolidaz Aktivitesine Etkisi

Preinkübasyon ve inkübasyon aşamalarında p-CMBA'in değişik konsantrasyonlarının serum prolidazı ve domuz böbrek prolidazı aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi incelendi. Sonuçlar tablo 4.7. ve 4.8'de verildi.

Tablo 4.7. p-CMBA'in preinkübasyon aşamasında ilavesi ile serum ve domuz böbrek prolidaz aktivitesi üzerine etkisi

Final p-CMBA Kon. (mmol/l)	Serum Prolidazı % Aktivite	Domuz Böbrek Prolidazı % Aktivite
0	100.0	100.0
10	42.0	55.4
20	4.8	34.5
30	-	26.3
40	-	-
50	-	-

Preinkübasyon aşamasında p-CMBA ilavesi ile insan serum ve domuz böbrek prolidaz aktivitelerinde azalma görüldü. Bu inhibisyon serum prolidazında daha fazla oldu.

p-CMBA ilavesi inkübasyon aşamasında yapıldığında ise daha değişik sonuçlar alındı.

Tablo 4.8. İnkübasyon aşamasında p-CMBA ilavesinin serum prolidaz ve domuz böbrek prolidaz aktivitesi üzerine etkisi

Final p-CMBA Kon.	Serum Prolidazı	Domuz Böbrek Prolidazı
(mmol/l)	% Aktivite	% Aktivite
0	100.0	100.0
10	69.0	95.0
20	67.6	90.0
30	63.0	57.0
40	38.8	33.6
50	28.0	22.9

p-CMBA inkübasyon aşamasında ilave edilince aktivitelerdeki kayıp daha az oldu. En yüksek p-CMBA konsantrasyonunda dahi aktivite saptandı.

4.13. İAA ve Glutasyonun Birlikte İlavesinin Prolidaz Aktivitesine Etkisi

Bu deneyimizde preinkübasyon ve inkübasyon olmak üzere iki aşamada gerçekleştirildi. Sonuçlar Tablo 4.9.'de verildi.

Tablo 4.9. Glutasyon ve İAA'nın preinkübasyon aşamasında ilavesi ile enzim aktivitesindeki değişiklik

İAA/Glutasyon (mmol/l)	Serum Prolidaz Aktivitesi (%)	Domuz Böbrek Prolidaz Aktivitesi (%)
0	100	100
10/10	60	10
10/20	56	6

Preinkübasyon aşamasında İAA ile beraber glutasyon ilavesinin, her iki prolidazda da inhibisyonun azalmasına sebep olduğu tespit edildi.

Tablo 4.10. Glutasyon ve İAA'nın inkübasyon aşamasında ilavesi ile enzim aktivitesindeki değişiklik

İAA/Glutasyon (mmol/l)	Serum Prolidaz Aktivitesi (%)	Domuz Böbrek Prolidaz Aktivitesi (%)
0	100.0	100
10/10	73.5	99
10/20	63.0	94

Glutasyonun İAA ile birlikte inkübasyon aşamasında ortama ilave edilmesinde ise alınan aktivite değerleri daha yüksekti.

BÖLÜM 5

TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Prolidaz insan dokularında yaygın olarak bulunan, kollajen yıkımında önemli rolü olan, spesifitesi yüksek bir hidrolazdır. Enzim uzun zamandan beri bilinmesine rağmen önemi son yıllarda anlaşılmıştır (Alparslan ve ark 1993, Phang et al 1995). Bu yüzden bu konuda az sayıda çalışma bulunmaktadır. Yapılan çalışmaların çoğu da eritrosit prolidazı ile ilgili olup serum prolidazı hakkında çok şey bilinmemektedir.

Bu bilgilerden yola çıkarak, çalışmamızda ilk aşamada insan serum prolidazının stabilitesi saptandı. Yapılan deneylerde enzimin -8 ve -20 °C 'da 1 yıl aktivitesini koruduğu gözlemlendi. Ayrıca +4 °C'da 1 gün süresince aktivitenin değişmediği, 2. günde ise aktivitede % 10 azalma olduğu saptandı. Serum örneklerinin -8 ve -20 °C 'da 2. kez dondurulup çözülmesinin de aktiviteyi etkilemediği tespit edildi. Bu bize örneklerin geniş bir zaman aralığında çalışabilme kolaylığını sağladı. Daha önceki çalışmalarda serum prolidazının stabilitesi ile ilgili herhangi bir bilgiye rastlanmadı.

İkinci aşamada; önceden kullanılan eritrosit ve serum prolidaz aktivitesi ölçüm yöntemleri modifiye edilerek, laboratuvar şartlarımıza uygun analiz koşulları oluşturuldu. Literatürdeki serum prolidaz aktivitesi ölçümünde, örnek 1/6 oranında (tampon + Mn^{+2} ile) sulandırılarak uzun süre (24 saat) preinkübe edilmiştir (Myara ve Myara 1984, Alparslan ve ark. 1993). Eritrosit prolidaz çalışmasında ise, preinkübasyon zamanı daha kısa

tutulmuş (2saat) ve hemolizat 1/200 oranında 2.5mmol/l Mn^{+2} ile sulandırılmıştır (Erbağcı ve Özdemir 1996). Bu verilerden hareketle uygun analiz koşulları oluşturmak üzere serum örnekleri ile bir çok çalışma yapıldı. Preinkübasyon zamanı olarak dört değişik zaman aralığında (1, 2, 4 ve 6 saat) çalışmalar yapıldı. En uygun sonuçlar 2 saatte alındı. 37 °C'ın üzerindeki sıcaklıklarda yapılan preinkübasyon deneylerinde ise (45°C ve 55 °C'da) aktivite alınamadı. Bu sıcaklıklarda enzimin denatüre olduğu düşünüldü. Deneylerimizin sonucunda en uygun preinkübasyon şartları şu şekilde saptandı:

Serum 1/40 oranında tampon ve Mn^{+2} ile (100µl serum + 1,9 ml tampon +2 ml Mn^{+2}) sulandırılarak 2 saat 37 °C'da preinkübe edildi. Bunun dışında çalışmanın bütün aşamalarında uygulanacak optimum koşullar aşağıda anlatıldığı biçimde tek tek saptandı.

Prolidaz bir metalloenzimdir. Aktivitesi için Mn^{+2} iyonuna gereksinim duyar. Mn^{+2} iyonu enzimin monomerlerini şelat bağı ile bağlayarak maksimum aktivite alınmasını sağlar. Daha önceki bütün çalışmalarda olduğu gibi bizim deneylerimizde de bu durum bir kez daha kanıtlandı. Hem insan serum hem de domuz böbrek prolidazı aktivite ölçümü Mn^{+2} 'li ve Mn^{+2} 'sız ortamlarda yapıldı. Serum prolidazında Mn^{+2} 'sız ortamda çok düşük aktivite (2.7mmolpro/lSaat) gözlenirken, değişik Mn^{+2} konsantrasyonlarında aktivitede önemli bir artış (23 kez) saptandı. Bu çalışmada optimum aktivite 2.5mmol/l Mn^{+2} final konsantrasyonu ile elde edildi. Aynı şekilde domuz böbrek prolidazı ile yapılan çalışmalarda Mn^{+2} 'nin enzimi (9.5 kez) aktive ettiği gözlemlendi. Serum prolidazında olduğu gibi optimum aktivite (final) 2.5mmol/l Mn^{+2} ile elde edildi. Bu sonuçlarımıza

dayanarak tüm deneylerimizde 2.5mmol/l Mn^{+2} kullanıldı. Daha önce bu konuda yapılmış çalışmalarda eritrosit prolidazının Mn^{+2} ile 42 kez aktive olduğu kaydedilmiştir. Optimum aktivite de 2.5mmol/l Mn^{+2} ile alınmıştır (Erbağcı ve Özdemir 1996). Bir başka çalışmada domuz böbrek prolidazı için optimal aktivitenin 10mmol/L Mn^{+2} ile elde edildiği saptanmıştır (Davis ve Smith 1957). Değişik enzim kaynaklarında bulunan prolidaz ile ilgili diğer çalışmalarda çok değişik Mn^{+2} konsantrasyonları kullanılmıştır. Bazılarında 1mmol/l kullanılırken, bazılarında 10mmol/l Mn^{+2} kullanılmıştır (Endo ve Tanoue 1990, Alparslan ve ark. 1993).

Mn^{+2} dışındaki bazı metal iyonlarının prolidaz aktivitesini nasıl etkilediğini araştırmak için, Mn^{+2} yerine +2 değerlikli diğer iyonlar (Fe^{+2} , Zn^{+2} , Hg^{+2} , Mg^{+2} , Cu^{+2} , Sr^{+2}) ortama ilave edildi. Metal iyonların serum prolidazı aktivite ölçüm ortamına tek başlarına ilave edildiğinde (tablo 4.1) aktivite tespit edilemedi. Serum prolidazı ile bu konuda daha önce yapılmış herhangi bir çalışmaya rastlanmadı. Aynı metal iyonları ile domuz böbrek prolidazının çalışmasında (tablo 4.1) ise, Sr^{+2} dışındaki iyonlarla çok az aktivite alınmasına rağmen Sr^{+2} ile aktivite alınamadı. Zn^{+2} , Cu^{+2} , Fe^{+2} , Hg^{+2} , Mg^{+2} iyonları ile enzim Mn^{+2} ile elde edilenin % 13 ile % 33 'ü kadar aktivite gösterdi. Bu sonuçlara göre enzimi en iyi aktive eden metalin Mn^{+2} olduğu bir kez daha ortaya konmuştur. Bu konuda 1957 yılında yapılan bir çalışmada domuz böbrek prolidazını Fe^{+2} , Co^{+2} , Cu^{+2} , Cu^{+1} , Zn^{+2} , Cd^{+2} , Ag^{+1} , Hg^{+2} , Pb^{+2} ve Pt^{+4} iyonlarının hiç aktive etmediği saptanmıştır (Davis ve Smith 1957). Ayrıca deri fibroblastlarından elde edilen prolidaz ile yapılan inhibisyon çalışmasında Mg^{+2} ve Fe^{+2} 'nin enzim aktivitesini fazla etkilemediği fakat Cu^{+2} , Hg^{+2} , Cd^{+2} , Zn^{+2} ve Pb^{+2} iyonları ile çok az aktivite elde edildiği kaydedilmiştir (Oono ve Arata 1988).

Metal iyonlarının Mn^{+2} ile birlikte aynı konsantrasyonda ve aynı zamanda ortama ilavesinin aktiviteyi nasıl etkilediği de incelendi. Serum prolidazında (tablo 4.2) Zn^{+2} ve Hg^{+2} iyonları Mn^{+2} ile beraber ortama ilave edildiğinde enzimi tamamen inhibe ederken Cu^{+2} , Fe^{+2} , Mg^{+2} ve Sr^{+2} iyonlarının Mn^{+2} ile ilavesi sonucu enzimdeki inhibisyonun azaldığı görüldü. Domuz böbrek prolidazında ise Mn^{+2} ile birlikte ilave edilen $+2$ değerlikli metal iyonları, bir önceki basamağa (tablo 4.1'e) göre aktivitede artışa sebep oldu. Mn^{+2} ile elde edilen aktivitenin % 25'inden % 86' sına kadar değişen aktivite değerleri elde edildi. Sr^{+2} iyonu tek başına iken aktivite elde edilmediği halde Mn^{+2} ile birlikte % 58 aktivite tespit edildi. Bu bulgulara göre tek başlarına Mn^{+2} gibi etkili olmayan bu metallerin, Mn^{+2} ile birlikte de Mn^{+2} kadar etkili olmadığı sonucuna varılmıştır.

Enzim aktivitesine tampon pH'sının etkisini incelemek için 6 değişik pH'da Trizma HCl tamponu (7.5- 9.6) kullanıldı. Yapılan çalışmada her iki enzim için de optimal pH'nın 8 olduğu tespit edildi (şekil 4.3 ve 4.4). Serum prolidazında tüm pH değerlerinde belirli oranlarda aktivite alınırken, domuz böbrek prolidazında pH: 9.2 ve 9.6 'da hiç aktivite gözlenmedi. Bu sonuçlarımıza dayanarak tüm çalışmalarımızda pH:8 olan Trizma HCl tamponu kullanıldı. Daha önceki çalışmalarda domuz böbrek ve eritrosit prolidazı için de optimal pH'nın 8 olduğu bildirilmiştir (Davis ve Smith 1957, Erbağcı ve Özdemir 1996).

Tampon pH'sının yanı sıra tampon konsantrasyonu da aktiviteyi etkilemektedir. Beş ayrı konsantrasyonda Trizma HCl tamponu (final konsantrasyonu 20-60 mmol/l) ile yapılan deneyin sonuçlarına göre (şekil 4.5) insan serum ve domuz böbrek prolidazı için optimal aktivitenin final

konsantrasyonu 40 mmol/l 'lik tampon ile alındığı saptandı. Bu yüzden çalışmalarımızda final konsantrasyonu 40 mmol/l olan tampon kullanıldı. Bu konuda eritrosit prolidaz ile yapılan bir çalışmada, tamponun konsantrasyonunun (30-70 mmol/l) aktiviteyi etkilemediği kaydedilmektedir (Erbağcı ve Özdemir 1996).

Bir enzim kaynağında aktivite ölçümü yapılırken, enzimin kinetik özelliklerinin ölçüm metoduna etkisi göz önünde bulundurularak, insan serum prolidazının hem glisil- prolin hem de alanil-prolin dipeptidi (final konsantrasyonu 10-50mmol/l) için Michaelis Menten eğrileri çizildi. Substrat olarak glisil prolin kullanılarak çizilen grafikte (şekil 4.6);

V_{max}: 70 mmol pro / 1 saat

K_m: 13 mmol/l olarak saptandı.

Alanil-prolin için ise (şekil 4.7) ;

V_{max} : 32.6 mmol pro / 1 saat

K_m: 14 mmol / l olarak saptandı.

Bu sonuçlardan enzimin substrat olarak alanil-proline göre glisil-prolini tercih ettiği tespit edildi. Enzimin substrata ilgisinin bir göstergesi olan K_m değeri glisil-prolin için daha küçük bulundu. K_m değeri küçüldükçe enzimin substrata ilgisi artmaktadır. Ayrıca serum prolidazının maksimum hızı final 30 mmol/L substrat ile ulaştığı tespit edildi. Daha önceki yayınlarda serumda V_{max} ve K_m saptama çalışmasına rastlanmamasına rağmen eritrosit prolidazının glisil-prolin için çizilen Michaelis Menten eğrisinde ise;

Vmax: 40 μ molpro/dak. /g Hb, Km: 7-8mmol/l olarak tespit edilmiştir (Erbağcı ve Özdemir 1996). Ayrıca eritrosit prolidazının glisil-prolini alanil-prolinden daha hızlı hidroliz ettiği belirtilmiştir (Kodama ve Mikasa 1988). İnsan böbrek prolidazı ile yapılan bir başka çalışmada, substrat olarak gly-pro ve phe-pro kullanılarak Michaelis Menten parametreleri saptanmıştır. Gly-pro için Vmax: 219 ± 11 μ mol/dak/mg, Km: 39.6 ± 3.1 mmol/l , phe-pro için Vmax: 28.9 ± 7.5 μ mol/dak/mg , Km: 7.2 ± 3.1 mmol/l olarak tespit edilmiştir (Myara ve Cosson 1994).

Glisil-prolin ve alanil-prolin dipeptidlerinin final konsantrasyonları 10-50mmol/l olan çözeltileri ile çalışılarak domuz böbrek prolidazı için de Michaelis Menten eğrileri çizildi (şekil 4.8 ve 4.9). Çizilen grafiklerden Vmax ve Km değerleri saptandı;

Glisil-prolin için; Vmax: 53 mmolpro/l saat

Km: 11 mmol / l

Alanil-prolin için; Vmax: 41.5 mmolpro/l saat

Km: 12 mmol / l olarak tespit edildi.

Bu sonuçlara göre domuz böbrek prolidazı da substrat olarak glisil-prolini tercih etmektedir. Bunu hem Vmax hem de Km değerinden anlamak mümkündür. Domuz böbrek prolidazı maksimum hıza final 40mmol/l substrat ile ulaştı. Görüldüğü gibi prolidaz aktivitesinin ölçüldüğü enzim kaynaklarının farklı oluşu enzimin kinetik özelliklerini veren parametreler üzerinde de farklılığa neden olmaktadır.

Bir metalloenzim olan prolidazın aktivitesi üzerine, katyon şelatörü olan EDTA' nın etkisini incelemek için yapılan çalışmada, EDTA preinkübasyon ve inkübasyon aşamasında olmak üzere iki farklı zamanda deney ortamına ilave edildi. Her ikisinde de EDTA' nın inhibitör etkisi farklı derecede gözlemlendi (tablo 4.3 ve 4.4). Preinkübasyon aşamasında EDTA, Mn^{+2} ile birlikte ilave edildiğinde inkübasyon aşamasına göre inhibisyonun daha fazla olduğu gözlemlendi.

İnkübasyon aşamasında ise her iki enzimde de inhibisyonun EDTA' nın konsantrasyonu arttıkça paralel olarak arttığı görüldü. Enzim Mn^{+2} ile aktive olduktan sonra EDTA eklendiğinden inhibisyon preinkübasyon aşamasında elde edilenden daha azdı. Daha önceden bazı araştırmacılar tarafından eritosit prolidazı ile yapılan inhibitör çalışmasında, iki farklı zamanda ve iki değişik konsantrasyonda (2.5 ve 5mmol/l) EDTA eklenerek aktiviteler ölçülmüştür. Preinkübasyon aşamasında 2.5mmol/l EDTA ilavesinde kontrolün % 38.9 'u kadar aktivite alınırken 5 mmol/l EDTA'da hiç aktivite alınamamıştır, inkübasyon aşamasında ise inhibisyon gözlenmemiştir (Erbağcı ve Özdemir 1996).

Prolidaz enziminin aktif merkezinde sülfidril grubu (-SH) varlığını araştırmak için, İAA iki aşamada ortama ilave edilerek sonuçlar incelendi. (tablo 4.5) Preinkübasyon ortamına yani substratdan önce ilave edilince serum prolidazında artan İAA konsantrasyonu ile orantılı azalan bir aktivite alındı. Domuz böbrek prolidazında ise İAA' in en düşük konsantrasyonunda (10mmol/l) bile aktivite alınamadı. Her iki enzimde de görülen bu inhibisyon prolidazın aktif merkezinde sülfidril (-SH) grubu olduğunu gösterir. İnkübasyon aşamasında İAA ilavesinde ise gözlenen inhibisyon

oranı daha azdı (tablo 4.6). Serum prolidazında İAA'in final 10-50mmol/l konsantrasyon aralığında birbirine yakın (kontrolün % 40- % 33.8'i) aktiviteler alınırken domuz böbrek prolidazında ise artan İAA konsantrasyonu ile paralel olarak artan bir inhibisyon saptandı. İAA enzimin aktif merkezindeki -SH grubunu bağlayarak substratın bağlanmasını engellemektedir. Bu yüzden eğer substrat konulmadan ortama İAA ilave (preinkübasyonda) edilirse enzimin aktif merkezi tahrip olmakta ve substratın ürüne dönüşümü olmamaktadır. Fakat İAA ilavesi substrat ile birlikte (inkübasyonda) olursa substratın bir kısmı ürüne dönüşebilmekte ve inhibisyon preinkübasyona göre daha az gerçekleşmektedir. İAA' in inhibitör etkisi daha önce de domuz böbrek prolidazında gösterilmiştir . Bu çalışma sonucunda da enzimin aktif merkezinde sülfidril olduğu İAA'in inhibisyonu ile açıklanmıştır. İAA ilavesi inkübasyondan önce (preinkübasyon) yapılırsa tamamen inhibisyon görüldüğü tespit edilmiş ve inhibisyonun geriye dönüşümsüz olduğu glutatyon ve sistein ile geriye döndürülemediği sonucuna varılmıştır (Davis ve Smith 1957). Bu konudaki başka çalışmada İAA ilavesi ile eritrosit prolidazının aktivitesindeki değişiklikler incelenmiştir. Preinkübasyonda 10-50mmol/l konsantrasyon aralığında İAA ilavesi ile kontrolün % 74- % 11'i arasında değişen aktiviteler alınırken, inkübasyonda bu aktiviteler kontrolün % 88.5-% 71.4'i olarak alınmıştır (Erbağcı ve Özdemir 1996).

İAA'den başka p-CMBA'in de enzim aktivitesi üzerindeki etkisi incelendi. Preinkübasyonda ilave edilen p-CMBA (tablo 4.7) her iki enzimin de aktivitesinde değişik oranlarda inhibisyona sebep oldu. Serum prolidazında en düşük p-CMBA konsantrasyonunda (final 10mmol/l) kontrolün % 42'si aktivite alınırken daha yüksek (20, 30, 40 mmol/l) konsantrasyonlarda

aktivite gözlenmedi. Benzer şekilde domuz böbrek prolidazında da ; p-CMBA konsantrasyonu arttıkça enzim aktivitesinde azalma tespit edildi. Burada da p-CMBA substratdan önce, preinkübasyon aşamasında ilave edildiğinde yüksek oranda inhibisyon görüldü. Çünkü inhibitör aktif merkezdeki sülfidril grubunu bağlayarak substratın ürüne dönüşümünü engellemektedir. İnkübasyon aşamasında ise inhibitör ile substrat aynı zamanda ortama ilave edildiğinden inhibisyon daha az oranda görülmektedir. İnkübasyon aşamasındaki p-CMBA ilavesinde ise gözlenen inhibisyon daha azdı (tablo 4.8) Serum prolidazında kontrole nazaran % 69 ile % 28 arasında (final konsantrasyon 10-50 mmol/l p-CMBA ile) aktivite görülürken, domuz böbrek prolidazında % 95 ' den % 22.9 'a değişen aktivite değerleri tespit edildi. İnhibisyonun iki enzimde farklı gözlenmesinin sebebi olarak, domuz böbrek prolidazının saf enzim olmasının, bununla birlikte prolidaz I ve II izoenzimlerinin her ikisini de birlikte içermesi düşünülebilir. Serumda ise sadece prolidaz I izoenziminin bulunduğu kaydedilmektedir. Literatürde bu konuda sadece domuz böbrek prolidazının p-CMBA ile reversible bir şekilde inhibe olduğu kaydedilmektedir (Davis ve Smith 1957). Son olarak İAA ile glutatyon aynı zamanda preinkübasyon ve inkübasyon ortamına ilave edilerek aktiviteler değerlendirildi. Preinkübasyonda, İAA' in tek başına ilavesi ile alınan aktivitelere göre bir miktar artış gözlendi (tablo 4.9). Bu artış her iki enzimde de tespit edildi. İnkübasyonda ise aktiviteler daha yüksekti (tablo 4.10). Yani inhibisyon daha azdı. Bu konuda literatürde domuz böbrek prolidazı ile yapılmış bir çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada İAA ile inhibisyonun irreversible olduğu glutatyon ya da sistein ile geri döndürülemeyeceği kaydedilmektedir (Davis ve Smith 1957).

Bu çalışma sonucunda herhangi bir hastalık grubunda değişik kaynaklardan çalışılacak enzimin tüm özelliklerinin (optimal deney koşulları, kinetik parametreleri ve aktivatör-inhibitör maddelere karşı davranışları) saptanması gerektiği sonucuna varılmıştır. Bu bulguların prolidaz ile yapılacak daha ileri çalışmalara ışık tutacağı kanısındayız.



SONUÇLAR

1. Serum prolidazın stabilitesini -8 ve -20 °C'da 1 yıl, +4 °C'da 1 gün koruduğu tespit edildi.
2. Aynı kişilerin kanlarından elde edilen serum ve plazmadaki prolidaz aktivite değerlerinin farklı olmadığı saptandı.
3. Optimum aktivite alabilmek için serum ve domuz böbrek prolidazının (tampon + Mn^{+2} ile) 1/40 oranında sulandırılıp 37 °C'da 2 saat preinkübe edilmesi gerektiği tespit edildi.
4. Serum ve domuz böbrek prolidazı için optimal tampon pH'sı 8, final konsantrasyonu 40 mmol/l olarak saptandı.
5. Mn^{+2} 'nin serum prolidaz aktivitesini 23 kez, domuz böbrek prolidaz aktivitesini 9.5 kez artırdığı gözlemlendi. Optimum Mn^{+2} final konsantrasyonu 2.5 mmol/l olarak belirlendi.
6. Mn^{+2} dışındaki metal iyonlarının (Fe^{+2} , Zn^{+2} , Hg^{+2} , Mg^{+2} , Cu^{+2} ve Sr^{+2}) serum prolidazını aktive etmediği, domuz böbrek prolidazını da düşük oranlarda aktive ettiği saptandı. Bu sonuçlar da enzimi en iyi aktive eden katyonun Mn^{+2} olduğunu bir kez daha göstermiştir.
7. Optimal aktivite için final substrat (glisil-prolin) konsantrasyonu insan serum prolidazı için 30 mmol/l, domuz böbrek prolidazı için 40 mmol/l olarak tespit edildi.

8. Serum prolidazında glisil-prolin için K_m : 13 mmol/l, alanil-prolin için 14 mmol/l bulunurken, domuz böbrek prolidazında glisil-prolin için 11 mmol/l, alanil-prolin için 12 mmol/l olarak saptandı.

9. EDTA, İAA ve p-CMBA'in hem serum hem de domuz böbrek prolidazının aktivitesini inhibe ettiği belirlendi. Bu inhibisyonun preinkübasyon aşamasında, inkübasyon aşamasına nazaran daha fazla olduğu gözlemlendi. EDTA'nın katyon bağlayıcı şelatör özelliğinden dolayı, İAA ve p-CMBA' inde enzimin aktif merkezindeki sülfidril grubunu (-SH) bağlayarak inhibisyona sebep oldukları kanısına varıldı.

10. İAA ile birlikte aynı anda ilave edilen glutatyonun İAA'nın inhibitör etkisini azalttığı saptandı.

KAYNAKLAR

- 1. DOLENGA, M., HECHTMAN, P.:** Prolidase Deficiency in Cultured Human Fibroblasts: Biochemical Pathology and Iminodipeptide- Enhanced Growth. *Pediatr Res.* 32(4): 479-482, 1992.
- 2. MILLIGAN, A., BROWN, G.:** Prolidase Deficiency : a Case Report and Literature Review. *Brit J Dermatol*, 121: 405-409, 1989.
- 3. ENDO, F., TANOUE, A. :** Biochemical Basis of Prolidase Deficiency. *J Clin Invest.* 85: 162-169, 1990.
- 4. COSSON, C., MYARA, I.:** Only Prolidase I Activity is Present in Human Plasma. *Int J Biochem.* 24(3): 427-432, 1992.
- 5. ERBAĞCI, B., ÖZDEMİR, Y.:** "Kinetic Properties of Human Erythrocyte Prolidase and Optimal Conditions of the Assay" 24th Meeting of Federation of European Biochemical Societies, 7-12 July 1996, Barcelona, Spain.
- 6. MYARA,I., MYARA, A.:** Plasma Prolidase Activity: A Possible Index of Collagen Catabolism in Chronic Liver Disease. *Clin Chem.* 30(2) : 211-215,1984.
- 7. ALPARSLAN, S., GÜLTEPE, M.:** Serum Prolidase Activity: Its Value as an Indicator of Collagen Accumulation in Chronic Liver Diseases. *Biyokimya Dergisi*, 18(1): 1-9, 1993.

8. YÜREĞİR, G. : Temel Biyokimya 1. 3. Baskı, Çukurova Üniv. Tıp Fak. Yayınları, Adana, 1988, 152-153

9. GÖZÜKARA, E. : Biyokimya 2. 2. Baskı, Evin Matbaası, Malatya 1994, 166-172

10. DAVIS, NC., SMITH ,EL.: Purification and Some Properties of Prolidase of Swine Kidney. J Biol Chem, 244: 261-275,1957.

11. BORIGHT, A.,SCRIVER, CR.: Prolidase Deficiency : Biochemical Classification of Alleles. Am J Hum Genet. 44: 731-740, 1989.

12. PHANG, JM., YEH GC., SCRIVER.: Disorders of Proline and Hydroxyproline Metabolism. In: The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease, (7th Ed) SCRIVER, RC., BLANDET, AL.,SLY,WS.,(Eds) Mc Graw Hill, Montreal . 1995,1125-1141.

13. MOCK, WL., ZHUANG, H. : Chemical Modification Locates Guanidinly and Carboxylate Groups within the Active Site of Prolidase. Biochem Biophy Res Com. 180(1): 401-406, 1991.

14. ENDO,F., TANOUE,A. : Primary Structure and Gene Localization of Human Prolidase. J Biol Chem. 264 : 4476-4481, 1989.

15. MOCK, W.L., GREEN,P.C.: BOYER,K.D.: Specificity and pH Dependence for Acylproline Cleavage by Prolidase. J Biol Chem, 265(32): 19600-19605, 1990.

- 16. BAI, JP., HU, M.:** Utilization of Peptide Carrier System to Improve Intestinal Absorption: Targeting Prolidase as a Prodrug-Converting Enzyme. *J Pharmacol Sci* .81(2): 113-116,1992.
- 17. RADZICKA, A., WOLFENDEN, R.:** Analogues of Intermediates in the Action of Pig Kidney Prolidase. *Biochemistry*. 30: 4160-4164, 1991
- 18. SCRIVER, CR.:** Disorders of Proline and Hydroxyproline Metabolism. In: *The Metabolic Basis of Inherited Disease* (4 th Ed) STANBURY, J .B., WYNGAARDEN, J. B., FREDRICKSON, S D.,SCRIVER,R.C.,(Eds) Mc Graw Hill, Montreal, 1978, 336-361.
- 19. MYARA, I., COSSON, C., MOATTI, N., LEMONNIER, A.:** Human Kidney Prolidase-Purification, Preincubation Properties and Immunological Reactivity. *Int J Biochem*. 26 (2): 207-214,1994.
- 20. BERARDESCA, E., FIDELL, D.:** Blood Transfusions in the Therapy of a Case of Prolidase Deficiency. *Brit J Dermatol*. 126 : 193-195 ,1992.
- 21. ONAT, T. , EMERK, K.,** Temel Biyokimya 2. Baskı,Saray Medikal Yayıncılık, İzmir, 1997 , 834-840.
- 22.CHAMPE,P.C., HARVEY,R.A.:** Biyokimya, TOKULLUGİL,A., (Çev.Ed). 2. Baskı . Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul,1994 s:166-172

23. TANOUE, A., ENDO,F.: Structural Organization of the Gene for Human Prolidase (Peptidase D) and Demonstration of a Partial Gene Deletion in a Patient with Prolidase Deficiency. J Biol Chem, 265(19):11306-11311, 1989.

24. TANOUE, A., ENDO, F.: Molecular Defect in Siblings with Prolidase Deficiency and Absence or Presence of Clinical Symptoms. J Clin Invest. 87: 1171-1176, 1991.

25. TANOUE, A., ENDO, F., MATSUDA, I.: The Human Prolidase Gene: Structure and Restriction Fragment Length Polymorphism. J Inher Metab Dis. 13:771-774, 1990.

26. ENDO, F., TANOUE, A.: Deduced Amino Acid Sequence of Human Prolidase and Molecular Analyses of Prolidase Deficiency. J Inher Metab Dis. 12: 351-354, 1989.

27. SUGAHARA,K., OHNO, T.: The Use of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry for the Identification and Quantification of Urinary Iminodipeptides in Prolidase Deficiency. Eur J Clin-Chem Clin Biochem. 31: 317-322, 1993.

28. OHHASHI ,T.,OHNO,T.: Characterization of Prolidase I and II from Erythrocytes of a Control, a Patient with Prolidase Deficiency and Her Mother.Clin Chim Acta, 187 : 1-10, 1990.

29. OONO, T., ARATA, J.: Characteristics of Prolidase and Prolinase in Prolidase-deficient Patients with Some Preliminary Studies of Their Role in Skin. *J Dermatol.* 15: 212-219, 1988.

30. MOCK, WL., GREEN, PC.: Mechanism and Inhibition of Prolidase. *J Biol Chem*, 265 (32): 19606-19610, 1990.

31. KODAMA, H., OHHASHI, T.: Characteristics and Partial Purification of Prolidase and Prolinase from Leukocytes of a Normal Human and a Patient with Prolidase Deficiency. *Clin Chim Acta*, 180: 65-72, 1989.

32. CHAMSON, A., VOIGTLANDER, V.: Collagen Biosynthesis Anomalies in Prolidase Deficiency: Effect of Glycyl-L-Proline on the Degradation of Newly Synthesized Collagen. *Clin Physiol Biochem.* 7: 128-136, 1989.

33. KODAMA, H., MIKASA, H.: Biochemical Investigations on Prolidase and Prolinase in Erythrocytes from Patients with Prolidase Deficiency. *Clin Chim Acta*, 173: 317-324, 1988.

34. TANOUE, A., ENDO, F.: A Single Nucleotide Change in the Prolidase Gene in Fibroblasts from Two Patients with Polypeptid Positive Prolidase Deficiency. *J Clin Invest.* 86: 351-355, 1990.

35. ZANABONI, G., VIGLIO, S.: Direct Monitoring of Prolidase Activity in Cultured Skin Fibroblasts Using Capillary Electrophoresis. *J Chromatogr.* 695: 77-84, 1997.

36. ENDO, F.,MATSUDA,I.: Human Erythrocyte Prolidase and Prolidase Deficiency.Pediatr Res,16 : 227-231, 1982.

37. SUGAHARA, K., KODAMA, H.: Liquid Chromatography-mass Spectrometry for Simultaneous Analyses of Iminodipeptides Containing an N-terminal or a C-terminal Proline. J Chromatogr. 565: 408-415, 1991.

38. KODAMA, H., NAKAMURA, H., SUGAHARA, K.: Liquid Chromatography-Mass Spectrometry for the Qualitative Analyses of Iminodipeptids in the Urine of Patients with Prolidase Deficiency. J Chromatogr. 527: 279-288, 1990.

39. PASTERNAK, C. A. : İnsan Biyokimyasına Giriş,CİLİV, G. (Çev.Ed) ,EMERK, K. (Çev.Ed), KARAN, A.(Çev.Ed). 2.Baskı, Hacettepe Üniv. Yayınları, Ankara, 1980, s: 291-299

40. BISSONETTE, R., DOMINIQUE, F.: Prolidase Deficiency: A Multisystemic Hereditary Disorder. J Am Acad Dermatol. 29(8) : 818-821, 1993.

41. JIANG, Z., YOU, D.: Monitoring of Serum Markers for Fibrosis During CCl₄ - induced Liver Damage. J Hepatol. 16: 282-289,1992.

42. GÜRDOL, F., GENÇ, S. : The Presence of Prolidase Activity in Amniotic Fluid and Its Evaluation as a Maturity Test. Biol Neonate.67(1): 34-38, 1995.

43. JOHNSEN, AH.: Nondestructive Amino Acid Analysis at the Picomole Level of Proline- Containing Peptides Using Aminopeptidase M and Prolidase: Application to Peptides Containing Tyrosine Sulfate. Anal Biochem. 197: 182-186, 1991.

44. SILVERMAN, ML.,CHRISTENSON, RH. Amino Acids and Proteins .In: Textbook of Clinical Chemistry ,TIETZ, N.W.,(Ed) Saunders, Philadelphia, 1986, 538-540.

45. LEHNINGER, AL., NELSON, DL., COX, MM.: Principles of Biochemistry. 2 nd Ed.,Worth Publishers, New York, 1993, 123-124, 173-174

ÖZGEÇMİŞ

1963 yılında Gaziantep'de doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Gaziantep'te tamamladı. 1980 yılında Hacettepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Bölümüne girerek 1985 yılında mezun oldu. 1986-1987 öğretim yılında aynı Fakültenin Organik Kimya Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak çalışmaya başladı. 1989 yılında Organik Kimyada yüksek lisansını tamamladı. Aynı yıl Gaziantep Üniversitesi Biyokimya Bölümünde kimyager olarak çalışmaya başladı. Halen görevine devam etmektedir.

Evli ve iki çocuklu olup, ingilizce bilmektedir.