

**ÇEŞİTLİ ANYONLARIN SERUM KOLİNESTERAZINA  
(PSÖDOKOLİNESTERAZ) ETKİSİ**

**E. Ferhan Tezcan \***

(Dergiye geliş tarihi : 2 Temmuz 1976)

**ÖZET**

Çeşitli anyonların serum Psödokolinesteraz aktivitesi üzerine etkisi araştırıldı.

Sitrat, oksalasetat ve bikarbonatın, düşük konsantrasyonlarda enzimin en etkili aktivatörleri olduğu bulundu. Fakat yüksek konsantrasyonlarda bu bileşikler enzimi inhibe ettiler. Sonuç olarak, bu bileşikler için enzimin üzerinde en az iki bağlanma yerinin varlığı söylenebilir. Birincisi allosterik denetleyici bağlanma yeri, ikincisi ise muhtemelen aktif merkezdir.

Ayrıca, laktat ve piruvat gibi bazı  $\alpha$  - hidroksi ve  $\alpha$  - keto substitue karboksilatların Psödokolinesteraz'ın inhibitörleri olduğu bulundu.

**SUMMARY**

The effects of the various kinds of anions on serum Pseudocholinesterase activity have been investigated.

Citrate, oxalacetate and bicarbonate have been found to be potent activators of the enzyme at low concentrations. But at high concentrations, they inhibit the enzyme. Consequently, there are at least two binding sites on the enzyme for these compounds. The first is an allosteric modifier site and the second is, possibly, the active center.

Additionally, certain  $\alpha$  - hydroxy and  $\alpha$  - keto substituted carboxylates, such as lactate and pyruvate, have been found to be the inhibitors of Pseudocholinesterase.

## GİRİŞ

Psödokolinesteraz, diğer bir deyişle kolinesteraz (asilkolinasilhidrolaz EC 3.1.1.8), serum proteinlerinin % 0,01 ini kapsar. Fizyolojik görevi tam olarak anlaşılammakla beraber, kolin esterlerinin hidrolizini katalizlediği bilinmektedir.

PKE (Psödokolinesteraz)'ın fonksiyonunu aydınlatmak amacıyla, bölümümüzde yapılan çalışmalar (1) sonunda, enzim plazmadan 10 000 kez saflaştırıldı ve kinetik araştırmalarla da enzimin allosterik bir davranışa sahip olduğu gösterildi (2). Enzimin a) Kuarterner azot içeren bileşikler (kolin ve türevleri), b) Anyonik karakter gösteren bileşikler olmak üzere, iki grup altında toplanabilen bir seri allosterik denetleyicisi (allosterik modifikatör) saptandı.

Callahan ve arkadaşları (3), PKE'nin fosfat tarafından aktive edildiğini göstermişler, Harris ve arkadaşları (4) ise diğer bir anyonu, fluorürü inhibitör olarak bildirerek, fluorüre hassas olmayan insan PKE varyantlarını tarif etmişlerdir.

Literatürde bildirilen bu çalışmalarla, bölümümüzde saptanan allosterik özellikler birleştirilince, anyon aktivasyon mekanizmasının aydınlatılması gereği ortaya çıkmış ve anyonların PKE üzerine olan etkisini araştıran bu çalışma yapılmıştır.

## GEREÇ

Çalışmada, bölümümüzde geliştirilen tekniğe göre saflaştırılan enzim örnekleri kullanıldı.

5,5'-Ditiyo-bis (2-nitrobenzoik asit), Aldrich Firması'ndan; kaproik asit ve valerik asit Calbiochem Firması'ndan; maleik anhidrit ve propionik asit Fisher Firması'ndan; diğer bileşikler ise Sigma Firması'ndan sağlanmışlardır.

## YÖNTEM

Aktivite tayinlerinde Ellman (5) tarafından tariflenen metod değiştirilerek uygulandı. Sübstrat olarak BTK (bütiril tiyokolin) iyodür kullanıldı (6). BTK diğer araştırmacılar (3, 4, 7, 8, 9) tarafından kullanılan benzoil kolinden daha hızlı olarak hidroliz olabilen bir sübstrattır. BTK'nın hidrolizi ile açığa çıkan tiyokolin, renk ayıracı olarak ortalama ilâve edilen DTNB [5,5'-ditiyo-bis (2-nitrobenzoik asit)]'i indirger. Enzim aktivitesi DTNB'nin indirgenmesiyle

oluşan sarı rengin, 412 nm'de Beckmann DU spektrofotometresinde 20 dakika takip edilmesiyle ölçüldü.

Deney sistemi olarak,  $2,5 \times 10^{-5}$  M BTK (pH 5,9),  $1,5 \times 10^{-5}$  M DTNB (pH 5,9), 3 mg/ml enzim (10 000 kez saf) ve çeşitli konsantrasyonlarda, sodyum tuzu şeklinde bileşik içeren bir ortam kullanıldı.

Denemelerin pH 5,9'da yapılmasının nedeni, hava  $\text{CO}_2$ 'sinin çözeltilerde çözünmesi ile oluşan  $\text{HCO}_3^-$  anyonunun, yüksek konsantrasyon ve yüksek pH'da enzimin en kuvvetli aktivatörlerinden biri olmasıdır.  $\text{C}^{14}\text{CO}_2$  kullanılarak yapılan kontrol denemeleri ile pH'nın uygunluğu saptandı.

pH ve enzim aktivasyonu (enzim substratı tarafından da aktive edilmektedir) göz önünde tutularak, deney ortamındaki allosterik denetleyici konsantrasyonunun  $5 \times 10^{-5}$  M'in üzerine çıkmamasına çalışıldı.

Protein tayinleri Lowry metoduna (10) göre yapıldı.

## BULGULAR

Deneylerden elde edilen bulgular dört grup altında özetlenebilir.

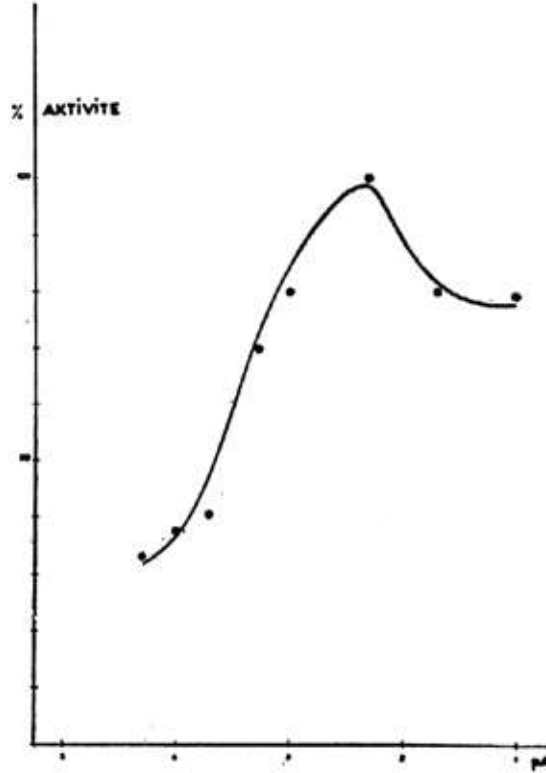
1 — Düşey eksene % aktivite (gözlenen en yüksek aktivite yüz kabul edilerek, diğer aktivitelerin hesaplanması ile elde edilir), yatay eksene aktivatör konsantrasyonunun negatif logaritması işaretlenerek grafikler çizildiğinde, allosterik kinetik modele (11) uygun eğriler elde edildi (Şekil - 1).

2 — Çeşitli bileşiklerin PKE aktivitesi üzerine etkisi Tablo - Ia, Tablo - Ib, Tablo - Ic, Tablo - Id de gösterilmiştir.

Farklı zamanlarda, farklı enzim örnekleri ile yapılan deney sonuçlarını aynı şartlara getirmek için, faktörler saptandı. Faktörler,  $5 \times 10^{-5}$  M bileşik içeren deney sistemlerinde, aynı enzim örneği ile çalışılarak saptanan deney sonuçlarının, aynı konsantrasyonda bileşik içeren, fakat farklı zaman ve şartlarda çalışılmış deney sonuçlarına oranlanmasıyla hesaplandı. Tablolardaki tüm aktiviteler ve % aktiviteler, bulunan faktörlere göre düzenlenen değerlerdir.

Görüldüğü gibi, monokarboksilatlardan format, asetat ve propionatın PKE için aktivatör; bütirat, valerat ve kaproatın etkisiz;

$\alpha$ -keto monokarboksilatlardan piruvatın inhibitör; gliksilat ve  $\alpha$ -keto isovaleratın aktivatör;  $\alpha$ -amino monokarboksilatlardan glisin ve alaninin aktivatör; valinin etkisiz;  $\alpha$ -hidroksi monokarboksilatlardan glikolat ve  $\alpha$ -hidroksi bütiratın aktivatör; laktatın ise inhibitör olduğu bulundu.



Şekil -1 Çeşitli aktivatör (format) konsantrasyonlarında enzim hızı yüzdesi. Düşey ekseninde hız yüzde olarak (gözlenen en yüksek hız yüz kabul edilerek) bildirilmiştir. Yatay ekseninde ise aktivatör konsantrasyonunun negatif logaritması işaretlenmiştir.

PKE'i, dikarboksilatlardan süksinat, glutarat ve adipatın aktive ettiği; doymamış dikarboksilatlardan sis konfigürasyonunda olan maleatın aktive ettiği; trans konfigürasyonundaki fumaratın etkisiz olduğu;  $\alpha$ -keto dikarboksilatlardan oksalasetat ve  $\alpha$ -keto glutaratın aktive ettiği; tri karboksilatlardan sitratın ve tetra karboksilatlardan EDTA (etilendiamin tetrasetik asit)'nin aktive ettiği; inorganik anyonlardan fosfat, arsenat ve yüksek pH'da bikarbonatın aktive ettiği gözlemlendi.

3 — Denenen bileşikler için, en yüksek ve en düşük % aktivite-ler oranlanarak, aktivasyon oranları hesaplandı (Tablo - II).

Aktivasyon oranlarından sitrat, oksalasetat ve bikarbonatın PKE'yi takriben 4 kez; fosfatın 3,5 - 4; format ve asetatın 3 - 3,5; EDTA ve maleatın 2,5 - 3 kez arsenatın 2 - 2,5; glisin, propionat, gli-kolat, süksinat ve adipatın 1,5 - 2; glutarat,  $\alpha$ -ketoglutarat,  $\alpha$ -hid-roksibütirat,  $\alpha$ -ketoisovalerat, alanin ve glioksilatın 1 - 1,5 kez ak-tive ettiği bulundu.

4 — Denenen bileşikler, kimyasal yapılarına göre değerlendirilip, aktivasyon oranları karşılaştırıldığında, inorganik anyonlar-dan fosfatın, arsenattan; monokarboksilatlardan asetatın, format-tan; formatın, propionattan, dikarboksilatlardan süksinat ve adi-patın, glutarattan; doymamış dikarboksilatlardan maleatın, fuma-rattan; trikarboksilatlardan sitratın, bütün diğer aktivatörlerden (EDTA ve maleat dahil);  $\alpha$ -amino monokarboksilatlardan glisinin, alaninden;  $\alpha$ -hidroksi monokarboksilatlardan glikolatın,  $\alpha$ -hidrok-sibütirattan daha etken aktivatör oldukları sonucuna varıldı.

### TARTIŞMA

Çalışmada, allosterik bir enzim olan PKE'nin (2) aktivasyo-

O

||

nunda R—C—O<sup>-</sup> yapısının yeri ve etki mekanizması saptandı.

R radikali (—OH) olduğunda (bikarbonat) enzim şiddetle ak-tive edilirse de, maksimum aktiviteye, yüksek konsantrasyon ve yüksek pH da erişilir (Tablo - Id) Radikal (—R), (—H) veya (—CH<sub>3</sub>) olduğunda, maksimum aktivite daha düşük denetleyici kon-santrasyonunda gözlenir (Tablo - Ia).

Bu bulgulardan, enzimin allosterik anyonik aktivatör bağlama yerinin küçük bir yer olduğu sonucu çıkar. Gerçekten de (—R) in, etil, propil, bütiril, pentenil kökleri veya dalı alifatik zincirler şek-linde büyümesi, karboksil grubunun aktivatör özelliğinin azalması-na yol açar (Tablo - Ia).

Fosfat, arsenat gibi anyonlar da, bu aktivatör bağlanma yeri-ne sığarak, enzimi aktive ederler (Tablo - Id).

O

||

Allosterik denetleyici molekülünde, R—C—O<sup>-</sup> yapısı birkaç kez tekrarlanıyorsa, bileşiğin aktivatör etkisi artar (sitrat ve EDTA)

(Tablo - Ic). Tekrarlanan üniteler birbirleri etrafında serbest rotasyon gösterirlerse (suksinat) veya ( $-R$ ) radikali büyük bir grupsa ( $\alpha$ -ketoglutarat) etki azalır (Tablo - Ic). Karboksil grupları birbirlerine göre trans durumunda olursa, enzimatik aktiviteyi etkilemezler (fumarat); aynı bileşiğin sis konfigürasyonunda olan şekli ise (maleat) enzimi aktivatör olarak etkiler (Tablo - Ic).

Sonuç olarak, aktivatör etkisinin sis konfigürasyonundaki karboksilat grubunun sayısına göre arttığı söylenebilir.

$\alpha$ -Substitüsyonlar ( $\alpha$ -amino,  $\alpha$ -hidroksi,  $\alpha$ -ketokarboksilatlar), karboksilatın PKE üzerindeki aktivatör bağlanma yerine sığmasını engelliyerek, aktivasyon etkisini azaltırlar.

Oksalasetat, bütün diğer keto asitlerin aksine, ( $-COO^-$ ) gruplarının uzaydaki uygun konformasyonu nedeniyle enzimin en etken aktivatörlerinden biridir.

Çalışmada gözleendiği gibi, aktivatörler allosterik modele (11, 12) uygun olarak, yüksek konsantrasyonda enzimi inhibe ederler (Şekil - 1). Buna neden, yüksek aktivatör konsantrasyonunda, aktif merkezde sübstratın hidroliz edildiği anyonik yer için, aktivatör ve sübstratın rekabetidir.

PKE'i inhibitör olarak etkiledikleri gözlenen laktat ve piruvatın, inhibisyon mekanizmalarını açıklayabilmek için, daha ileri kinetik çalışmalara gerek vardır.

#### KAYNAKLAR

1. ÖZAND, P. T., RENDA, N., TEZCAN, E. F., KARAHASANOĞLU, A. M., MERGEN, K. A New Method for the Purification and Crystallization of Human Serum Pseudocholinesterase. Yayınlanmamıştır.
2. ÖZAND, P. T., KARAHASANOĞLU, A. M., TEZCAN, E. F., EMERK, K. The Allosteric Behaviour of Crystalline Pseudocholinesterase. Yayınlanmamıştır.
3. CALLAHAN, S., LA DU, B. N. Effect of Ionic Strength on Normal and Atypical Pseudocholinesterase Activity. Fed. Proc., 24, 610 (1965).
4. HARRIS, H., WHITTAKER, M. Differential Inhibition of Human Serum Cholinesterase with Fluoride : Recognition of Two New Phenotypes., Nature, Lond., 191, 496 (1961).
5. ELLMAN, G. C., COURTNEY, K. P., ANDRES, V. Jr. FEATHERSTONE, R. M. A New Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity., Biochem. Pharmacol., 7, 88 (1961).

6. KARAHASANOĞLU, A. M., ÖZAND, P. T. Pseudocholinesterases I. A Quick Screening Test for Determination of Serum Pseudocholinesterase Activity., *Turkish J. Pediat.*, 8, 1 (1966).
7. KALOW, W., GENEST, K., STARON, N. Kinetic Studies on the Hydrolysis of Benzoylcholine by Human Serum Cholinesterase . *Can. J. Biochem. Physiol.*, 34, 637 (1956).
8. HARRIS, H. Enzymes and Drug Sensitivity. The Genetics of Serum Cholinesterase «Deficiency» in Relation to Suxamethonium Apnoea., *Proc. Roy. Soc. Med.*, 57, 503 (1964).
9. SWIFT, M.R., LA DU, B. N. A Rapid Screening Test for Atypical Serum - Cholinesterase., *Lancet*, 1, 513 (1966).
10. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. and RANDALL, R. L., Protein Measurements with the Folin Phenol Reagent., *J. Biol. Chem.*, 193, 265 (1951).
11. MONOD, J., WYMAN, J., CHANGEUX, J. P., On the Nature of Allosteric Transitions : A Plausible Model. *J. Mol. Biol.*, 12, 88 (1965).
12. KOSHLAND, D. E. Jr., NEMETHY, G., FILMER, D. Comparison of Experimental Binding Data and Theoretical Models in Proteins Containing Subunits., *Biochemistry*, 5, 365 (1966).

Tablo - I a

## MONOKARBOKSİLATLARIN PKE AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ

A : Aktivite, 20 dakikada oluşan redükte DTNA nin 412 nm de verdiği O.D.x10<sup>3</sup>  
 % A : Yüzde aktivite (aktivitenin, aktiviteilerin maksimumuna oranı)

Allosterik  
 Deactleyici  
 Konsantras-  
 yonu  
 (M)

	Format		Asetat		Propionat		Bütirat		Valerat		Kaproat	
	A	% A	A	% A	A	% A	A	% A	A	% A	A	% A
5 x 10 <sup>-5</sup>	11,8	33	12,7	29	25,0	54	30,2	90	29,0	100	10,0	90
1 x 10 <sup>-4</sup>	13,2	37	14,7	33	24,3	53	31,3	93	29,0	100	11,0	100
2 x 10 <sup>-4</sup>	14,5	40	—	—	27,0	59	31,3	93	29,0	100	11,0	100
5 x 10 <sup>-4</sup>	25,0	70	17,6	40	27,0	59	31,3	93	27,0	93	10,0	90
1 x 10 <sup>-3</sup>	27,7	78	21,5	49	30,0	65	30,2	90	26,0	90	10,0	90
2 x 10 <sup>-3</sup>	22,4	63	24,5	55	30,0	65	31,3	93	26,0	90	11,0	100
5 x 10 <sup>-3</sup>	35,6	100	28,4	64	38,5	84	33,6	100	29,0	100	10,0	90
1 x 10 <sup>-2</sup>	25,0	70	27,4	62	37,0	81	30,2	90	27,0	93	11,0	100
2 x 10 <sup>-2</sup>	27,7	78	33,3	76	40,7	89	31,3	93	27,0	93	11,0	100
1 x 10 <sup>-1</sup>	29,0	81	44,1	100	45,7	100	—	—	—	—	—	—



Table - I b

**$\alpha$ -SUBSTITUE MONOKARBOKSİLATLARIN PKE AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ**

A : Aktivite, 20 dakikada oluşan redükte DTNA nin 412 nm de verdiği O.D.x10<sup>3</sup>  
 % A : Yüzde aktivite (aktivitenin, aktivitelerin maksimuma oranı)

Allosterik		$\alpha$ -Amino Monokarboksilatlar		$\alpha$ -Hidroksi Monokarboksilatlar		$\alpha$ -Keto Monokarboksilatlar												
Denetleyici		Alanin		Valin		Glikolat												
Konsantras-yonu		Glisin		Piruvat		Glikolato valerat												
(M)	A	% A	A	% A	A	% A	A	% A	A	% A	A	% A						
5 x 10 <sup>-5</sup>	24,8	57	36,8	89	18,4	91	14,9	94	15,0	100	10,7	92	20,8	62	54,0	100	21,0	84
1 x 10 <sup>-4</sup>	25,7	59	37,7	91	17,5	86	14,9	94	15,0	100	11,2	96	21,8	65	52,0	96	21,0	84
2 x 10 <sup>-4</sup>	25,7	59	37,7	91	17,5	86	14,9	94	15,0	100	11,2	96	24,9	75	47,0	87	21,0	84
5 x 10 <sup>-4</sup>	25,7	59	40,5	98	17,5	86	15,8	100	15,0	100	11,6	100	23,0	84	53,0	98	25,0	100
1 x 10 <sup>-3</sup>	25,7	59	41,4	100	17,5	86	15,8	100	15,0	100	10,7	92	33,3	100	52,0	96	22,0	88
2 x 10 <sup>-3</sup>	26,7	61	39,5	95	17,5	86	15,8	100	14,0	93	10,2	88	22,9	68	42,0	78	21,0	84
5 x 10 <sup>-3</sup>	33,0	76	38,6	93	20,2	100	9,3	58	12,5	83	7,0	60	19,7	59	41,0	76	18,0	72
1 x 10 <sup>-2</sup>	42,3	98	29,4	71	18,4	91	5,6	35	9,5	63	3,7	32	18,7	56	—	—	14,0	56
2 x 10 <sup>-2</sup>	43,2	100	27,6	66	18,4	91	5,6	35	8,0	53	3,7	32	11,4	34	32,0	59	12,0	48
1 x 10 <sup>-1</sup>	36,8	85	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Tablo - I c

## POLİKARBOKSİLATLARIN PKE AKTİVİTESİ ÜZERİNE ETKİSİ

A : Aktivite, 20 dakikada oluşan redükte DTNA nin 412 nm de verdiği O.D.x10<sup>3</sup>  
 % A : Yüzde aktivite (aktivitenin, aktivitelerin maksimumuna oranı)

Allosterik Deneyleyici Konsantras- yonu	Dikarboksilatlar			Doymamış Dikarboksilatlar			c-Ketodikarboksi- latlar			Tri ve Tetra karboksilatlar								
	Suksinat		Glutarat	Adipat		Maleat	Fumarat	Oksal- asetat	c-Ketoglu- tarat	Sitrat	EDTA							
	A	% A	A	% A	A	% A	A	% A	A	% A	A	% A						
5 x 10 <sup>-5</sup>	39,7	61	39,8	70	23,0	60	31,3	37	12,0	92	33,2	23	39,7	91	23,7	23	11,7	29
1 x 10 <sup>-4</sup>	39,7	61	39,8	70	23,0	60	40,3	47	12,0	92	33,2	23	35,8	82	25,2	25	14,0	35
2 x 10 <sup>-4</sup>	39,7	61	39,8	70	24,3	62	40,3	47	11,0	85	33,2	23	35,8	82	32,5	32	17,5	44
5 x 10 <sup>-4</sup>	39,7	61	42,4	75	24,3	62	44,8	52	13,0	100	42,0	29	37,1	85	23,6	29	23,4	58
1 x 10 <sup>-3</sup>	39,7	61	42,4	75	24,3	62	53,7	63	12,0	92	42,0	29	37,1	85	32,5	32	24,5	61
2 x 10 <sup>-3</sup>	42,2	64	50,7	90	25,5	66	44,9	52	11,0	85	57,7	40	35,8	82	34,0	34	26,9	67
5 x 10 <sup>-3</sup>	48,6	74	55,2	97	35,2	90	58,2	65	11,0	85	100,5	70	37,7	86	100,6	100	39,8	100
1 x 10 <sup>-2</sup>	55,0	87	56,5	100	35,2	90	71,7	84	12,0	92	127,7	87	43,5	100	85,8	85	39,8	100
2 x 10 <sup>-2</sup>	62,7	96	51,4	91	38,8	100	85,1	100	12,0	92	143,5	100	43,5	100	84,3	84	37,4	94
1 x 10 <sup>-1</sup>	65,3	100	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	38,4	88	—	—	—	—

**Tablo - I d**  
**İNORGANİK ANYONLARIN PKE AKTİVİTESİ ÜZERİNE**  
**ETKİSİ**

A : Aktivite, 20 dakikada oluşan redükte DTNB nin 412 nm de verdiği O.D.x10<sup>3</sup>

% A : Yüzde aktivite (aktivitenin, aktiviteelrin maksimumuna oranı)

Allosterik Denetleyici Konsantrasyonu (M)	Fosfat		Arsenat		Bikarbonat*	
	A	% A	A	% A	A	% A
5 x 10 <sup>-5</sup>	16,7	26	6,5	50	34,0	24
1 x 10 <sup>-4</sup>	18,6	29	6,0	46	38,0	25
2 x 10 <sup>-4</sup>	18,6	29	6,5	50	38,0	27
5 x 10 <sup>-4</sup>	22,3	35	8,0	61	43,0	30
1 x 10 <sup>-3</sup>	27,9	44	8,0	61	44,0	31
2 x 10 <sup>-3</sup>	26,0	41	8,0	61	49,0	35
5 x 10 <sup>-3</sup>	51,0	80	13,0	100	106,0	76
1 x 10 <sup>-2</sup>	63,2	100	13,0	100	126,0	90
2 x 10 <sup>-2</sup>	59,5	94	9,0	69	139,0	100

(\*) pH 8,1 de çalışılmıştır.

**Tablo - II**  
**PKE'NİN ALLOSTERİK DENETLEYİCİLERİNİN**  
**ETKENLİK SIRASI**

<b>Grup No</b>	<b>Aktivasyon Oranı</b>	<b>Denetleyiciler</b>
1	4 den fazla	Oksalasetat Bikarbonat Sitrat
2	3,5 — 4,0	Fosfat
3	3,0 — 3,5	Asetat Format
4	2,5 — 3,0	EDTA Glikolat Maleat
5	2,0 — 2,5	Arsenat
6	1,5 — 2,0	Propionat Glisin Adipat Süksinat
7	1,0 — 1,5	Alanin Glutarat $\alpha$ -Ketoglutarat $\alpha$ -Hidroksibütirat
8	Aktive Etmeyenler	Fumarat Valin Kaproat Valerat Bütirat
9	Inhibitörler	Laktat Piruvat