

**ERİTROSİT ZARI  $Ca^{2+}$  ATPaz ENZİMİNİN KİNETİK ÖZELLİKLERİ VE  
ENZİM AKTİVİTESİNE PEROKSİTLERİN ETKİSİ**  
**Kinetic properties of erythrocyte membrane  $Ca^{2+}$  ATPase and  
effects of peroxides on the activity of the enzyme**

S Seyhan Tükel<sup>1</sup>, Ramazan Bilgin<sup>2</sup>, Sibel Pürçüklü<sup>3</sup>, M Fatih Kızal<sup>4</sup>

**Özet:** Hayvansal organizmaların hücre içi ve hücre dışı kalsiyum iyonlarının fizyolojik sınırlar içerisinde sabit tutulmasından sorumlu olan  $Ca^{2+}$  ATPaz enziminin aktivitesi insan eritrosit zarlarında farklı inkübasyon ortamları kullanılarak ölçülmüş, enzimin aktivatörü olduğu bildirilen kalmodulinin (CaM) enzim aktivitesine etkisi incelenmiştir. Enzimatik reaksiyonun maksimum hızı (Vm), 16  $\mu$ mol Pi/mg prot. saat, Michaelis-Menten hız sabiti (Km), 1,9 mM ve aktivasyon enerjisi (Ea), 4,5 kkal/mol olarak bulunmuştur. Aktif oksijen bileşiklerinden hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve tersiyer butil hidroperoksidin (t-BHP) enzim aktivitesini azalttığı ancak t-BHP'in  $H_2O_2$ 'ye göre daha fazla inhibisyon etkisine sahip olduğu saptanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:**  $Ca^{2+}$  ATPaz, t-BHP,  $H_2O_2$

**Summary:** Activity of human erythrocyte membrane  $Ca^{2+}$  ATPase which is responsible for maintaining the inside and outside  $Ca^{2+}$  concentration of the cell within physiological limits, was measured by using different incubation mediums. The effect of calmodulin (CaM) on the activity of the enzyme was investigated. Maximum velocity of the reaction (specific activity) (Vm), Michaelis-Menten Coefficient (Km) and activation energy (Ea) were determined as 16  $\mu$ mol Pi/mg prot.h, 1.9 mM and 4.5 kcall/mol, respectively. Effects of two activated oxygen species, tert-butyl hydroperoxide (t-BHP) and hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) on the enzyme activity were also determined. Both peroxides inhibited the enzyme activity, however their effects were different and t-BHP has more inhibitory effect than  $H_2O_2$ .

**Key Words :**  $Ca^{2+}$  ATPase, t-BHP,  $H_2O_2$

Hayvansal organizmalara ait hücrelerde hücre içi serbest  $Ca^{2+}$  derişimi (0,1  $\mu$ M), hücre dışı  $Ca^{2+}$  derişiminden (1,0 mM) çok düşüktür. Hücre içi  $Ca^{2+}$  düzeyi, hormonal bir uyarıya bağlı olarak hücre zarındaki veya hücre içinde bulunan endoplazmik retikulum ve mitokondri zarlarındaki  $Ca^{2+}$  kanallarının geçici olarak açılması ile aniden 1  $\mu$ M'a kadar yükselir. Hücre içi  $Ca^{2+}$  düzeyinin artması hücre içindeki çeşitli enzimlerin aktif hale geçmesine, glikojenin parçalanıp kullanılmasına, bazı zararlı maddelerin hücre dışına atılmasına, kas hücrelerinde kasılmaya neden olur. Ancak görevi bittiği anda  $Ca^{2+}$  iyonlarının yeniden 0,1  $\mu$ M seviyesine düşürülmesi gerekir. Aksi halde

uyarı süreklidir ve  $Ca^{2+}$  iyonları hücre içinde bol bulunan fosfatlarla kalsiyum fosfat olarak çökelir. Fazla  $Ca^{2+}$  'un hücre dışına atılmasını, hücre içi  $Ca^{2+}$  derişiminin ayarlanmasını hücre zarında yerleşmiş olan  $Ca^{2+}$  ATPaz enzimi (EC:3.1.6.38) gerçekleştirir. Bu enzim  $Ca^{2+}$  'un hücre dışına taşınması sırasında ATP'nin hidrolizi ile açığa çıkan enerjiyi kullanır (1-3). İlk kez 1973 yılında Bond ve Clough (4) insan eritrositlerinde  $Ca^{2+}$  ATPaz'ı aktive eden bir aktivatör proteinin (Kalmodulin) varlığını göstermiştir, ancak günümüzde henüz kalmodulinin etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir (5-7).

Hücre zarında bulunan enzimlerin aktivitesinin enzimin yakın çevresindeki lipidlerle ve/veya enzim proteinin kendi kompozisyon ve konformasyonunda meydana gelen değişikliklerden etkilendiği bildirilmektedir (8). Bu değişikliklere neden olabilecek ajanlar arasında

Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi ADANA  
Kimya Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalı. Prof.Dr.<sup>1</sup>,  
Y.Doç.Dr.<sup>2</sup>, Araş.Gör.<sup>3</sup>, Y. Lis. Öğr.<sup>4</sup>.

Geliş tarihi: 31 Ekim 1994

oksidan bileşikler önemli bir yer tutmakta ve çeşitli peroksitlerin hücre zarına ve hücre zarı enzimlerine etkileri araştırılmaktadır (8-10).

Bu çalışmada insan eritrositlerine ait zarlarda  $Ca^{2+}$  ATPaz enziminin maksimum aktivite gösterdiği koşulların seçilerek  $Ca^{2+}$  ve kalmodulinin enzim aktivitesine etkisi; enzimin  $V_m$ ,  $K_m$ ,  $E_a$  gibi kinetik parametrelerinin saptanması ve  $H_2O_2$ , t-BHP'in enzim aktivitesine etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

## METODLAR

Araştırmada kullanılan tüm kimyasallar analitik kalitede olup Sigma ve Merck firmalarından alınmıştır. Araştırmada kullanılan kan örnekleri Ç.Ü Tıp Fakültesi Kan Bankasından sağlanmıştır.

Eritrosit zarlarının hazırlanmasında Hanahan ve Echolm (11) tarafından bildirilen ve esası hipotonik şoka dayanan yöntem kullanılmıştır. Zar örneklerinin protein içerikleri Lowry yöntemi (12) ile tayin edilmiş ve örnekler kullanılmaya dek  $-20^\circ C$  de saklanmıştır. Enzimin en yüksek aktivite gösterdiği koşulların saptanması amacıyla üç değişik inkübasyon ortamı denenmiş ve en yüksek aktivitenin görüldüğü Lynch ve ark. (1) tarafından bildirilen ve son derişimleri 40 mM Tris-HCl (pH:7.4), 3 mM  $MgCl_2$ , 80 mM NaCl, 20 mM KCl, 0,2 mM ouabain, 100  $\mu M$  EGTA, 100  $\mu M$   $CaCl_2$ , 0,2 mM kalmodulin ve 0,1 mg/ml zar proteini olacak şekilde hazırlanan inkübasyon ortamı kullanılmıştır. Ölçümler  $Ca^{2+}$  ve kalmodulin yokluğunda,  $Ca^{2+}$  varlığında kalmodulin yokluğunda,  $Ca^{2+}$  yokluğunda kalmodulin varlığında ve hem  $Ca^{2+}$  hem kalmodulin varlığında olmak üzere dört ayrı koşulda farklı ATP derişimleri için yapılmıştır.

$Ca^{2+}$  ATPaz aktivitesinin ölçümü belirlenen inkübasyon ortamında enzimin birim zamanda

ATP'den açığa çıkardığı inorganik fosfatın (Pi) ölçülmesine dayanmaktadır. İnorganik fosfatın ölçümünde Atkinson ve ark (13) tarafından bildirilen yöntem kullanılmış ve enzim aktivitesi  $\mu mol$  Pi/mg prot.saad olarak verilmiştir.

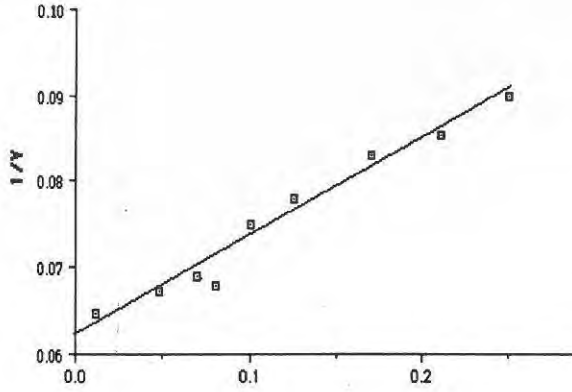
$H_2O_2$  ve t-BHP'in etkilerini araştırmak için yapılan çalışmalarda eritrositler son derişimleri 0,1 ; 0,2 ; 0,3 ; 0,4 ve 0,5 mM olacak şekilde ayrı ayrı söz konusu peroksitlerde,  $37^\circ C$ 'de yarım saat muamele edilmişlerdir. Bu hücreler serum fizyolojik ile üç kez yıkandıktan sonra hücre zarları hazırlanarak  $Ca^{2+}$  ATPaz aktivitesi tayin edilmiştir.

Yapılan istatistik analizlerinde  $y=b+ax$  doğru denklemini, R ise korelasyon katsayısını göstermektedir.

## BULGULAR

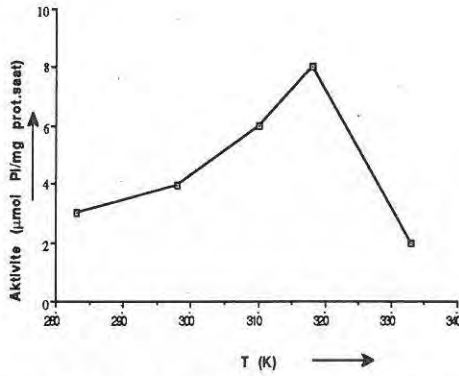
Farklı substrat (ATP) derişimlerinde  $Ca^{2+}$  ve kalmodulin yokluğunda,  $Ca^{2+}$  varlığında kalmodulin yokluğunda,  $Ca^{2+}$  yokluğunda kalmodulin varlığında ve hem  $Ca^{2+}$  hem kalmodulin varlığında ölçülen  $Ca^{2+}$  ATPaz aktivite Tablo I'de verilmiştir.

Enzim aktivitesinin en yüksek olduğu  $Ca^{2+}$  ve kalmodulin varlığında enzim için Line-Weaver Burk grafiği çizilmiş, Şekil 1, ve bu şekilden enzim için  $V_m=16 \mu mol$  Pi/mg prot.saad,  $K_m=1,9$  mM olarak hesaplanmıştır. Enzim aktivitesinin sıcaklığa bağlı derişimleri farklı sıcaklıklarda (10, 25, 37, 45,  $60^\circ C$ ) araştırılmış ve derişimler Şekil 2'de gösterilmiştir. Bu bulgulardan faydalanılarak Arrhenius sıcaklık eğrisi çizilmiş, Şekil 3,ve bu şekilden faydalanılarak enzimin aktivasyon enerjisi 4,7 kkal/mol olarak hesaplanmıştır. t-BHP ve  $H_2O_2$ 'nin enzim aktivitesine etkileri ayrı ayrı incelenmiş ve bulgular sırasıyla Şekil 4 ve Şekil 5'de gösterilmiştir.

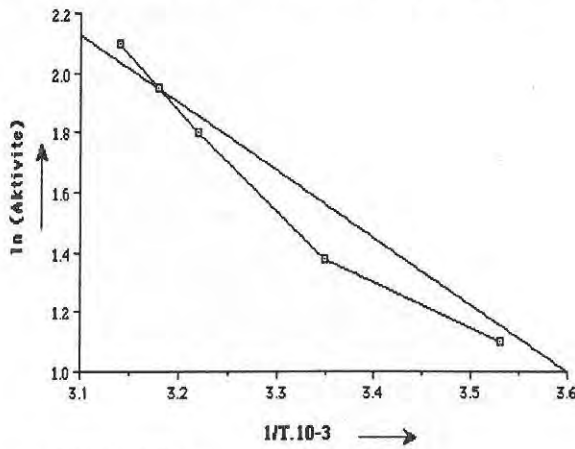


$$y = 6.1128e-2 + 0.12104x \quad R = 0.97$$

Şekil 1.  $Ca^{2+}$  ve Kalmodulin varlığında Line-Weaver Burk grafiği

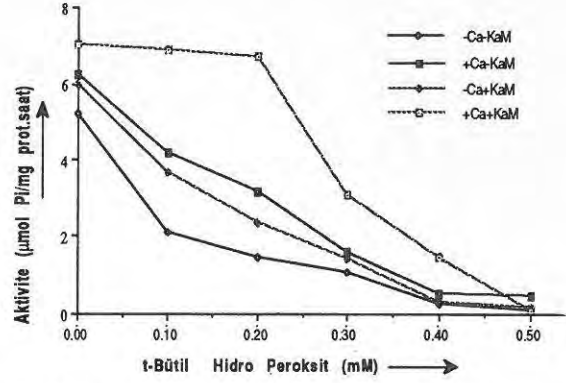


Şekil 2. Enzim aktivitesinin sıcaklığa bağlı değişimi

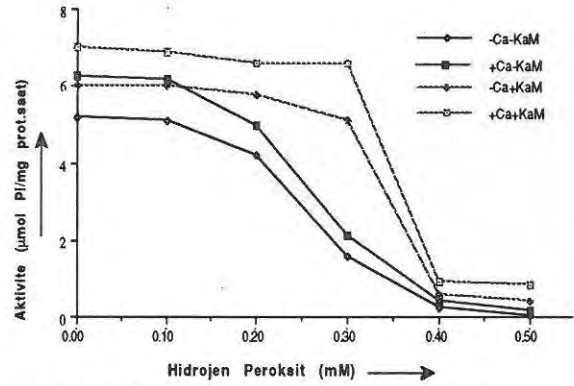


$$y = 10.034 - 2.5494x \quad R = 0.98$$

Şekil 3.  $Ca^{2+}$  ATPaz enzimi için Arrhenius sıcaklık eğrisi



Şekil 4. t-butül hidroperoksitin dört farklı koşulda enzim aktivitesine etkisi



Şekil 5. Hidrojen peroksitin dört farklı koşulda enzim aktivitesine etkisi

**Tablo I.** Farklı substrat derişimleri için  $Ca^{2+}$  ve kalmodulin yokluğunda (-  $Ca^{2+}$  - CaM),  $Ca^{2+}$  varlığında ve kalmodulin yokluğunda (+  $Ca^{2+}$  - CaM),  $Ca^{2+}$  yokluğunda ve kalmodulin varlığında (-  $Ca^{2+}$  + CaM) ve hem  $Ca^{2+}$  hem kalmodulin varlığında (+  $Ca^{2+}$  + CaM)  $Ca^{2+}$  ATPaz aktiviteleeri

ATP (mM)	$Ca^{2+}$ ATPaz Aktivitesi ( $\mu$ mol Pi/mg prot.saad)			
	- $Ca^{2+}$ - CaM	+ $Ca^{2+}$ - CaM	- $Ca^{2+}$ + CaM-	+ $Ca^{2+}$ + CaM
0,1	0,04	0,09	0,08	0,23
0,2	0,20	0,35	0,30	0,35
0,3	0,30	0,50	0,40	0,70
0,4	0,50	0,75	0,60	0,77
0,5	1,50	2,40	2,00	4,00
1,0	2,00	2,80	2,40	5,50
2,0	2,40	3,98	3,00	7,80
4,0	7,80	10,5	9,50	11,0
6,0	9,20	11,5	10,4	12,0
8,0	10,40	11,8	10,8	12,7
10,0	10,80	13,2	11,6	13,2
12,0	11,00	13,3	11,8	14,6
15,0	11,01	13,4	12,0	14,6

## TARTIŞMA

Tablo I'den görüleceği gibi tüm ATP derişimleri için en yüksek enzim aktivitesi hem  $Ca^{2+}$  hem de kalmodulinin birlikte bulunduğu koşullarda ölçülmüştür. Tek başına  $Ca^{2+}$  veya kalmodulin  $Ca^{2+}$  ATPaz aktivitesinde hafif artışlara neden olurken ikisinin birlikte bulunması enzim aktivitesinde anlamlı artışlara neden olmuştur. Bu bulgu  $Ca^{2+}$  varlığında ortamda CaM 'de bulunuyorsa enzimin maksimum aktivitesine ulaşabileceğini göstermektedir.

Niggli ve ark (14) kalmodulin - ilgi kromatografisi ile saflaştırdıkları enzim için maksimum hızı 3,8  $\mu$ mol Pi/mg prot.saad olarak, Graf ve ark. (15) 21,2  $\mu$ mol Pi/mg prot.saad olarak, Moore ve ark. (8) ise 0,539  $\mu$ mol Pi/mg prot.saad olarak rapor etmişlerdir. Lynch ve Cheung (1) kalmodulin varlığında enzimin tek bir Km değerine sahip olduğunu ve Km'nin 120  $\mu$ M olduğunu rapor etmişlerdir. Caride ve ark (6) ise kalmodulin varlığında enzimin biri düşük diğeri yüksek ilgili olmak üzere iki farklı ATP bağlama bölgesine sahip olduğunu ve bu bölgeler için gözlenen Km değerlerinin sırasıyla 100-500  $\mu$ M ve 2-10  $\mu$ M olduğunu bildirmişlerdir. Bizim bulgularımız enzim için tek bir Km değerinin olduğunu göstermektedir.

Enzim aktivitesinin sıcaklığa bağlı

değişiminin incelenmesinden (Şekil 2), enzim aktivitesinin 45 °C 'ye kadar sıcaklık ile orantılı olarak arttığı, 45°C 'den sonra azalmaya başladığı ve 60 °C 'de aktivitenin oldukça düştüğü görülmektedir. Bu bulgu enzimin 45 °C 'nin üzerindeki sıcaklıklarda denatüre olmaya başladığını göstermektedir. Enzimin aktivasyon enerjisi ise Arrhenius eğrisinden (Şekil 3), faydalanılarak 4,7 kkal/mol olarak hesaplanmıştır.

t-HBP (Şekil 4), ve  $H_2O_2$  (Şekil 5), varlığında enzimin inhibe edildiği, inhibisyon derecesinin peroksitlerin derişimi ve inkübasyon koşullarına bağlı olduğu görülmüştür. Hem  $Ca^{2+}$  hem kalmodulin varlığında yapılan ölçümler bu koşulda enzimin aktivitesinin peroksitlerin etkisine karşı daha korunmuş olduğunu göstermektedir. Şekil 4 ve Şekil 5'in karşılaştırılmasından görüleceği gibi t-BHP'in inhibitör etkisi  $H_2O_2$ 'ten daha fazladır.  $Ca^{2+}$  ve kalmodulin varlığında hidrojen peroksitin inhibitör etkisi 0,3 mM ve üstündeki derişimler için saptanırken, t-BHP için inhibitör etki 0,2 mM ve üstü derişimler için görülmüştür. Literatürde Moore ve ark (8) ile Rohn ve ark (10) benzeri bulgular rapor etmişlerdir. Bu durumun organik peroksitlerin anorganik peroksitlere göre lipidlerde çözünürlüğünün yüksek oluşu ve hücre içine daha kolay girerek daha fazla zararlı etki yapıyor olmalarından kaynaklanabileceği sonucuna varılmıştır.

## KAYNAKLAR

1. Lynch TJ, Cheung WY. Human erythrocyte  $Ca^{2+}$ - $Mg^{2+}$  ATPase : Mechanism of stimulation by  $Ca^{2+}$ . *Arc Biochem Biophys* 1979; 194: 165-170.
2. Pikula S, Wrzosek A, Famulski K.S. Long term stabilization and crystallization of  $(Ca^{2+}$ - $Mg^{2+})$ ATPase of detergent solubilized erythrocyte plasma membrane. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1061 : 206-214.
3. Roelofsen B, Schatzmann HJ. The lipid requirement of the  $(Ca^{2+}$ - $Mg^{2+})$ -ATPase in the human erythrocyte membrane as studied by various highly purified phospholipases. *Biochim Biophys Acta* 1977; 464 : 17-36.
4. Bond GH, Clough DL. A Soluble protein activator of  $(Mg^{2+}$ - $Ca^{2+})$  dependent ATPase in human red cell membranes. *Biochim Biophys Acta* 1973; 323 : 592-599.
5. Bzdega T, Kosk-Kosicka D. Regulation of the erythrocyte  $Ca^{2+}$  ATPase by mutant calmodulins with Glu-Ala substitutions in the  $Ca^{2+}$  binding domains. *J Biol Chem* 1992; 267 : 4394-4397.
6. Caride AJ, Rossi JPFC, Garrahan JP, Alcides FR. Does calmodulin regulate the affinity of the human red cell  $Ca^{2+}$  pump to ATP? *Biochim Biophys Acta* 1991; 1027 : 21-24.
7. Vorherr T, Kessler T, Hofmann F, Carafoli E. The calmodulin binding domain mediates the self association of the plasma membrane  $Ca^{2+}$  pump. *J Biol Chem* 1991; 266 : 22-27.
8. Moore RB, Brummitt ML, Mankad VN. Hydroperoxides selectively inhibit human erythrocyte membrane enzymes. *Arch Biochem Biophys* 1989; 273 : 527-534.
9. Huang W, Wang Y, Askari A, Zolotarjova N, Ganjeizadeh M. Different sensitivities of the  $Na^{+}/K^{+}$  ATPase isoform to oxidants. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1190 : 108-114.
10. Rohn TT, Hinds TR, Vincenzi FF. Inhibition of the  $Ca^{2+}$  pump of intact red blood cells by t-butyl hydroperoxide: Importance of glutathione peroxidase. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1153 : 67-76.
11. Hanahan UJ, Eckholm JE. The preparation of red cell ghosts (Membranes). *Methods Enzymol* 1974; 31: 168-172.
12. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randal KJ. Protein measurement with the folin-phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
13. Atkinson A, Gatenby AD, Lowe AG. The determination of inorganic orthophosphates in biological systems. *Biochim Biophys Acta* 1973; 320 : 195-204.
14. Niggli V, Penniston JT, Carafoli E. Purification of the  $(Ca^{2+}$ - $Mg^{2+})$ -ATPase from human erythrocyte membranes using a calmodulin affinity column. *J Biol Chem* 1979; 254 : 9955-9958.
15. Graf E, Verma AK, Gorski PJ, et al. Molecular properties of calcium pumping ATPase from human erythrocytes. *Biochemistry* 1982; 27 : 4511-4516.