

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ONKOGENLERİN ETKİLERİNİN
POLİAMİNLER TARAFINDAN
MODİFİKASYONU**

BİYOKİMYA PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

M. CAFER SAYILIR

ANKARA-1994

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ONKOGENLERİN ETKİLERİNİN
POLİAMİNLER TARAFINDAN
MODİFİKASYONU**

BİYOKİMYA PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

M. CAFER SAYILIR

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ
PROF. DR. WAYNE E. CRİSS

25296

ANKARA-1994

2066-94

YÜKSEK LİSANS TEZ SAVUNMA JÜRİSİ

PROF. DR. E. FERHAN TEZCAN

BAŞKAN

PROF. DR. WAYNE E. CRİSS

DANIŞMAN

DOÇ. DR. KAMER KILINÇ

ÜYE

İÇİNDEKİLER

SAYFA NO

Giriş.....	1
Protein Kinazlar.....	1
Kazein Kinazlar.....	3
Kazein Kinaz I.....	3
Kazein Kinaz II.....	4
Kazein Kinaz II'nin Substratları.....	7
Poliaminlerle Kazein Kinaz II Aktivitesinin Düzenlenmesi.....	8
Kazein Kinaz II'nin Otofosforilasyonu.....	10
Poliamin Bağımlı Kazein-Kinaz II'nin Aktivasyonu.....	11
Onkogenler ve Onkoproteinler.....	13
Amaç.....	15
Gereç ve Yöntemler.....	16
Araç ve Gereçler.....	16
Yöntemler.....	17
Dokunun Alınışı ve Homojenatın Hazırlanışı.....	17
Enzim Aktivitesi Tayini.....	17
SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrez.....	18
Bulgular.....	20
Tris-HCl Tamponu (pH 7.5) İçerisinde Kazein Kinaz II Aktivasyonu.....	20
Fosfat Tamponu (pH 7.5) İçerisinde Kazein Kinaz II Aktivasyonu.....	20
Kazein Kinaz II Aktivitesine GTP İçeren Ortamda Na ⁺ İyonunun Etkisi.....	23

ATP İçeren Ortamlarda Kazein Kinaz II Aktivitesi.....	23
Kazein Kinaz II Aktivitesine ATP İçeren Ortamda Na ⁺ iyonunun Etkisi.....	23
Değişik Konsantrasyonlardaki Poliaminlerin Kazein Kinaz II Aktivitesi Üzerine Etkileri.....	27
Kazein Kinaz II Enziminin Değişik Konsantrasyonlarda Dekstran Sülfat ve Heparin ile İnhibisyonu.....	34
pH'in Kazein Kinaz II Aktivitesine Etkisi	34
Kazein Kinaz II'nin Natif Substratlarının SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrezinde Tayini.....	38
-GTP varlığında yapılan alışma.....	38
-ATP varlığında yapılan alışma.....	40
Kazein Kinaz II Enzimi İçin Onkoprotein Substratları.....	42
Tartışma.....	44
Özet.....	47
Summary.....	48
Kaynaklar.....	49

GİRİŞ

Protein Kinazlar:

Protein kinazlar hücrenin spesifik reseptörlerinin uyarılması sonucu oluşan siklik nükleotidler, diaçilgliserol, poliaminler ve inositol fosfat gibi bileşiklerin etkileri sonucunda aktive olup belli proteinlere ve enzimlere fosfat grubu takarak sinyal iletimi, biyokimyasal metabolik reaksiyonlar ve gen düzenlenmesi gibi hücresel yanıtların oluşmasını sağlayan enzimler grubudur. Genelde fosfat vericisi olarak ATP'yi, metal kofaktör olarak da Mg^{++} 'u kullanırlar. Bütün ökaryotik hücrelerde bulunurlar ve etkileri hücrenin konumuna göre değişir. Substratlarını serin, treonin ve trozin amino asitleri üzerinden fosforile ederler. En yaygın substratları: Na^+/H^+ ve K^+ iyon kanalları, bazı zar reseptörleri, protein fosforilaz, glikojen sentetaz, myc onkoproteinleridir. Substratların fosforile edilmesi etki olarak ya aktivasyon ya da inhibisyon şeklindedirler(1).

Protein kinazlar düzenleyicilerine göre şu şekilde sınıflandırılmışlardır:

- Siklik-nükleotid bağımlı protein kinazlar
- Ca^{++} -kalmodulin bağımlı protein kinazlar
- Nükleotid veya Ca^{++} -kalmoduline bağımlı olmayan protein kinazlar

Trozin ve serin-treonin protein kinazlar, diğ er protein kinazlar gibi kofaktör bağımlılığı göstermezler. Kazein kinaz ne nükleotid ne de Ca^{++} -kalmodulin bağımlı bir enzimdir. Bu enzim Mg^{++} ve Mn^{++} iyonu içeren ortamlarda, GTP veya ATP'yi fosfat vericisi olarak kullanarak proteinleri serin ve treonin amino asit birimlerinden fosforile eder. Trozin kinazlar ise sadece ATP'yi fosfat vericisi olarak kullanarak Mn^{++} iyonu ile proteinlerin trozin amino asit birimlerini fosforile ederler(2).

Kazein Kinazlar:

Kazein kinazlar siklik nükleotid ve Ca^{++} 'a bağımlı olmadan fosvitin ve kazein gibi asidik proteinleri fosforile edebilen serin-treonin protein kinazlardır. Metabolik yolların düzenlenmesinde, hücre çoğalmasında, hücre dışı ve hücre içi sinyallerin iletiminde önemli rol oynayan bu enzimler farklı dokulardan izole edilmiştir (3). Fosfosellüloz kolonu kullanılarak yapılan çalışmalarla kazein kinaz I ve kazein kinaz II olmak üzere iki ayrı gruba ayrılmışlardır (4).

Kazein Kinaz I:

Kazein kinaz I sitoplazma, hücre zarı ve çekirdekte bulunup, yaklaşık 38-40 kDa molekül ağırlığına sahip monomerik bir enzimdir. Bu enzim sadece ATP'yi fosfat vericisi olarak kullanır ve proteinlerin yalnız serin amino asit birimlerini fosforile eder. Enzim aktivitesi 10 mM $MgCl_2$ varlığında en yüksek olup, serin ve treonin amino asitlerinden otofosforilasyona uğrayabilir.

Kazein kinaz I spermin, polilizin ve heparinin yüksek, NaCl'ün düşük konsantrasyonlarında inaktif hale gelir(3).

Kazein Kinaz II:

Kazein kinaz II tetramerik yapıda olup α , α' , β gibi heterojen alt birimlerden oluşan serin-treonin protein kinazlardandır (5-8). Hücre zarı, mitokondri, sitoplazma ve çekirdekten izole edilen kazein kinaz II iki büyük α ve α' altbiriminden ve iki küçük β altbiriminden oluşur. α altbirimi yaklaşık 36-44 kDa, α' altbirimi 37-42 kDa, β altbirimi ise 24-28 kDa molekül ağırlığına sahiptir(3).

α altbirimleri katalitik aktiviteye, β altbirimi ise düzenleyici role sahiptir (9,10). Kazein kinaz II üç farklı şekilde bulunur: $\alpha\alpha'\beta_2$, $\alpha_2\beta_2$, $\alpha'_2\beta_2$ (11).

Polilizin, spermin, poliarjinin gibi polikatyonik bileşiklerle aktive, 2-3 bifosfoglisarat, heparin ve diğer sülfatlı glikozaminoglikan gibi polianyonik bileşiklerle inaktive olan kazein kinaz II, β altbirimi üzerinden otofosforile olur(10,12).

Genomik DNA ve cDNA gibi hibridizasyon yöntemleriyle insan kazein kinaz II'sine alt altbirimlerin gen bölgeleri saptanmıştır. Bunlar, α altbirimi için 11. kromozom üzerinde iki, β -altbirimi için ise 6. kromozom üzerinde bir gen bölgesidir. β geni 6. kromozom üzerinde p12-p21 bölgesindedir ve 4.2 kbp uzunluğunda yedi exon bölgesine ayrılan bir yapıya sahiptir(13).

Enzimin α ve α' altbirimleri nükleotid yönünden %73, amino asit sırası yönünden ise %81 benzerdir ve her iki altbirim katalitik fonksiyonlara sahiptir(11).

İnsülin, insülin benzeri büyüme faktörü, epidermal büyüme faktörü gibi mitojenik uyarıcılardan etkilenmiş hücrelerde kazein kinaz II'nin kısa süreli olarak aktive edildiği gözlenmiştir(14,15).

Kazein kinaz II normal şartlar altında ATP ile β altbirimi üzerinden N-terminalindeki serin amino asit birimlerinden otofosforile olur. Polilizin, poliarjinin gibi polikasyonik bileşikler β altbiriminin otofosforilasyonunu inaktive, histonlar ise aktive ederler. Histonların neden olduğu otofosforilasyonun, bazik polipeptidlerle elde edilen aktivasyondan daha yüksek olduğu saptanmıştır(10). Kazein kinaz II'nin optimal aktivitesi için Mg^{++} ve Mn^{++} gibi iyonlar gereklidir. Enzim ATP'yi kullandığı gibi GTP'yi de aynı şartlar altında kullanma yeteneğine sahiptir.

Hücreler arası kompartımanlardan ve çekirdekten izole edilen kazein kinaz II, hücre içi poliamin konsantrasyonlarının artışına bağlı olarak hücrenin gelişimine ve çoğalışına yönelik olaylarda önemli rol oynar.

Yapılan bir çok çalışmada kazein kinaz II'nin hücre gelişiminin düzenlenmesinde ve sinyal iletiminde önemli biyolojik rollere sahip olduğu; ayrıca beyin, karaciğer gibi yüksek metabolizmaya sahip dokularda yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu saptanmıştır(15).

Hücre içerisinde enzimin çok önemli substratları vardır. Hayati fonksiyonlara sahip olan bu proteinlerin aktivasyonunda veya inaktivasyonunda rol oynayan kazein kinaz II'nin hücrenin genetik kontrolüyle ilişkili proteinlerden, sinir sistemi regülasyonunda önemli işlevlere sahip proteinlere kadar substratları bulunmakta ve daha bilinmeyen bir çok endojen substratları olabileceği düşünülmektedir.

Kazein Kinaz II'nin Substratları:

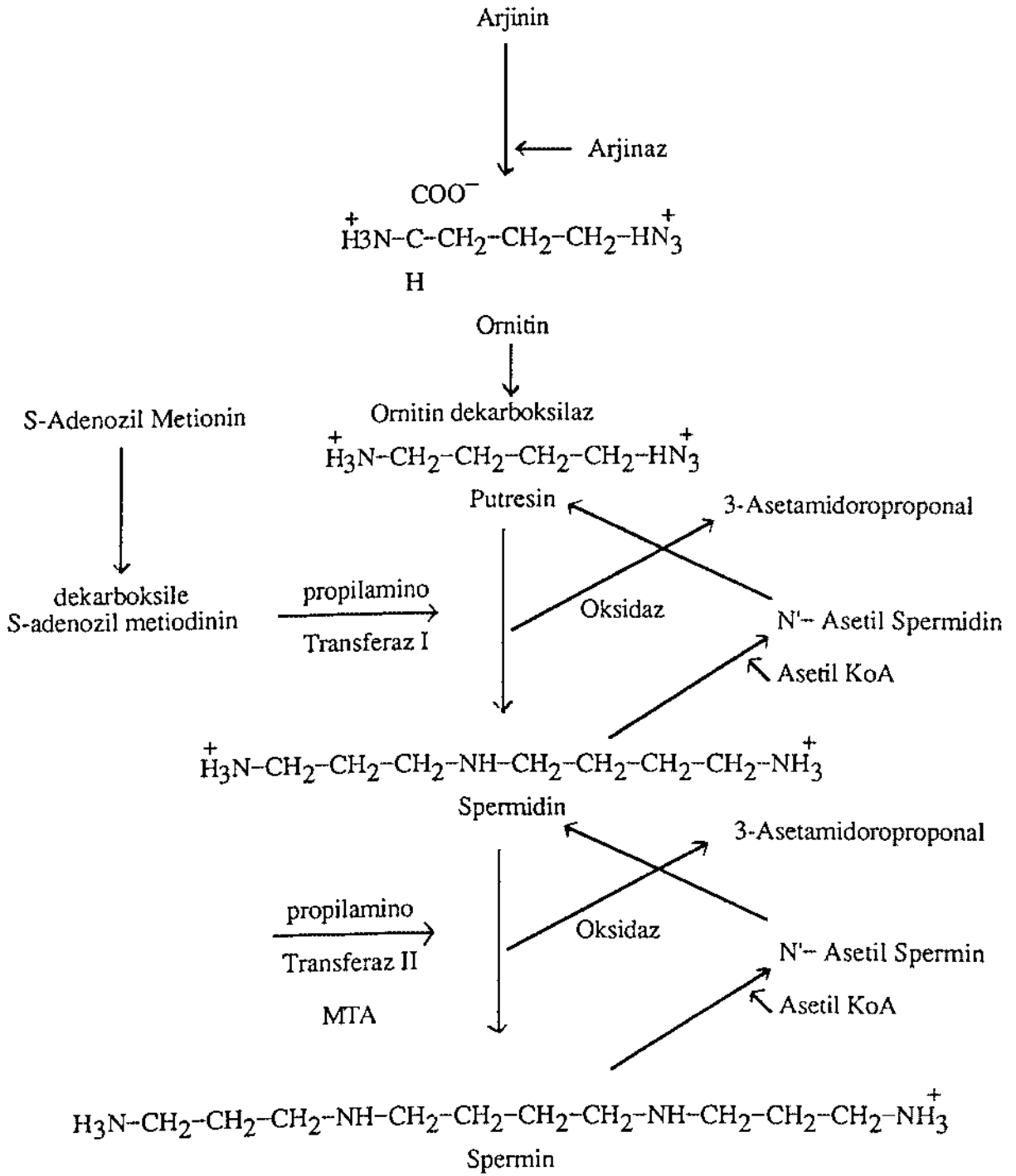
Kazein kinaz II'nin en önemli substratları kazein ve fosvitindir (16-18). Kazein kinaz II'nin diğer substratları da aşağıda verilmiştir:

Ornitin dekarboksilaz
Tubulin
Kalmodulin
Sinaptotagmin
Protimozin
Serum cevap faktörü
Kalsiyum kanal proteinleri
Tümör supresör gen ürünleri
cAMP bağımlı protein kinazlar
Myozin ağır zinciri
DNA topoizomeras I, II
Asetil-KoA karboksilaz
Glikojen sentaz
Fibrinogen
Spektrin
Çekirdek proteinler
Onkogen proteinler (myc, myb, src, Erb β)
Nükleolin

Poliaminlerle Kazein Kinaz II Aktivitesinin Düzenlenmesi:

Poliaminler normal insan hücresinde belirli konsantrasyonlarda bulunan polikatyonik bileşiklerdir. Hücre içi poliamin konsantrasyonu ile hücre gelişimi arasında güçlü bir pozitif ilişki vardır. Hızlı gelişen hücrelerde poliamin konsantrasyonu yüksektir oysa yavaş gelişen hücrelerde bu oran düşüktür.

Metilglioxal bis guanihidrazon, 5-florouasil ve metothroxate gibi gelişimi inhibe edici bileşiklerle etkileşime giren hücrelerde poliamin metabolizmasının akıbeti bir çok çalışmalara konu olmuştur. Bu pürin veya primidin antimetabolitleri kanser hücresinde çoğalmayı durduracak etkiyi, poliaminlerin sentezinde hız kısıtlayıcı enzimi inhibe ederek sağlarlar. Bu nedenle kan poliamin düzeyinin ölçülmesi kanser tedavisinde parametre olarak düşünülebilir (19-21). Gerçekten de kazein kinaz II'nin poliamin metabolizmasında hız kısıtlayıcı enzim olan ornitin dekarboksilazı fosforile ettiği gösterilmiştir(22). Hücreler arası kompartmanlarda poliamin konsantrasyonları ile hücre içi poliamin konsantrasyonları bize hücrelerin aktivasyonları, gelişimleri ve çoğalma hızları ile ilgili bilgiler verebilir. Poliaminlerin sentez mekanizması (Şekil 1'de) gösterilmiştir.



Şekil 1: Poliaminlerin metabolizması

Kazein Kinaz II'nin Otofosforilasyonu:

In Vivo şartlar altında kazein kinaz II aktivitesinin düzenlenme modeli pek anlaşılmamıştır. İnsan karsinoma hücresinde kazein kinaz II'nin β altbirimi üzerinden otofosforile olduğu gözlenirken, tavşan retikülositlerinde hem α hem de β altbirimlerinde fosforilasyona rastlanmıştır. Saf kazein kinaz II'nin β altbiriminin otofosforilasyonu polilizin gibi bazik polipeptidlerle inhibe olurken, α altbiriminde ise otofosforilasyonun arttığı gözlenmiştir. Bu tip bileşikler içeren ortamlarda, kazein kinazın α ve α' altbirimleri modifiye olarak aktif hale geçer ve enzimin katalitik fonksiyonunda bir artış gözlenir. Kazein kinaz II'nin normal hücrede α/β otofosforilasyon oranı 0.1, polilizin varlığında ise 50 civarındadır(10).

α altbirimi geninin ekspresyonu sonucu oluşan proteinin, β altbirimi geninin transkripsiyonunu aktive ettiği gözlenmiştir. β altbiriminin promotor bölgesi ile α altbirimi proteinin kompleks yaptığı açıklanmıştır. β altbirimi geninin primer transkripsiyon başlama bölgesinin 170-239 bp yukarısındaki promotor bölgede kazein kinaz II'nin β geni ile kazein kinaz II'nin α proteininin kompleks oluşturduğu gözlenmiştir ve bu bölge G-C nükleotidleri yönünden zengindir(13).

Pollamin Bağımlı Kazein-Kinaz II'nin Aktivasyonu:

SDS-poliakrilamid jel elektroforezi ile yapılan in Vitro çalışmalarda, polilizinle protein fosforilasyonu yanıtının araştırılması sonucu polilizin ile aktive, heparin ile inaktive olan enzimin çözünür sitoplazmik proteinleri fosforilleme yeteneğinin, membran proteinlerine göre daha fazla olduğu gözlenmiştir(15).

Epidermal büyüme faktörü ve insülinin fizyolojik konsantrasyonlarına maruz kalan hücrelerde kazein kinaz II'nin fosforilasyon aktivitesinin arttığı, hücre çoğalması ile gelişiminde rol oynayan sinyal iletiminde ise hücre içi poliamin düzeyine bağlı olarak biyolojik bir role sahip olduğu bilinmektedir.

Ayrıca beyinde bulunan ve santral sinir sisteminde nörohormonlara yanıtta yer alan proteinlerin kazein kinaz II için önemli fizyolojik substratlar olduğu da saptanmıştır(15).

Tavşan göz siliar hücrelerinde kazein kinaz II'nin 13 proteini fosforile ettiği bilinmektedir. SDS-poliakrilamid jel elektroforezi ile, küçük molekül ağırlığına sahip proteinlerde, sabit zamanda [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP ile fosforilasyonun daha düşük, büyük molekül ağırlığına sahip proteinlerde ise daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Konsantrasyona bağlı çalışmalarda, yüksek polilizin konsantrasyonuna sahip ortamlarda daha fazla fosfoproteine rastlandığı; membran proteinlerinin enzimle daha kısa sürede, buna karşılık çözünür sitoplazmik proteinlerin daha uzun sürede fosforilendiği yapılan zamana bağlı çalışmalarla gösterilmiştir(15).

Kazein kinaz II ile protein kinaz C'nin mitojenik hücrelerde, hücrel proteinleri fosforilleme derecesi arasında bir paralellik olduğu da bilinmektedir.

Sitoplazmik protein kinazların inhibitörleri tedavi edici öneme sahiptir. Örneğin anti östrojenik tamoksifenin protein kinaz C'nin inhibitörü olduğu ve tedavi edici özelliğe sahip olduğu açıklanmıştır (23).

Onkogenler ve Onkoproteinler:

Normal insan hücrelerinde protoonkogenler olarak inaktif halde yer alan onkogenler, transdüksiyon, insersiyonel mutagenesis, kromozomal translokasyon, gen amplifikasyonu, transaktivasyon, modülasyon ve delesyon gibi bilinen mekanizmalarla kansere yor açar.

İnsan hücrelerinde protoonkogenler ile onkosupresör genler arasındaki oranın bozulmaması, vücutta onkogenlere karşı baskılayıcı ve savunucu işlevler olduğunu gösterir. Bu onkogenlerin ekspresyonu ile oluşan onkoproteinlerin bazıları salgılanmış büyüme faktörlerine benzerler. Sis onkoproteini platelet kaynaklı büyüme faktörlerinin özellikle β zincirine benzer. Erb β onkoproteini ise büyüme faktör reseptörlerine, özellikle epidermal büyüme faktör reseptörü yapısına benzer (24-26). Ras, src, fps, abl, yes gibi onkoproteinler zarın sitoplazmaya bakan iç kısmına yerleşmişlerdir ve sinyal iletiminde, aracılık ettiklerine inanılır. Mos, raf onkoproteinleri ise sitoplazmadadır ve doğrudan proteinlerin serin-treonin aminoasit birimlerini fosforile eden protein kinazlardır. Myc, myb jun, sv 40 LT genlerince kodlanan fosfoproteinler DNA'ya bağlanmaktadır ve DNA replikasyonu, transkripsiyonu gibi hücre çoğalışına yönelik olaylarda rol oynarlar. Kazein kinaz II bu onkoproteinlerden bazılarını fosforile ederek aktivasyonlara neden olur (Tablo I) (27).

Tablo I: Onkoproteinlerin lokalizasyonu ve biyokimyasal özellikleri

GEN	Yerleşim	Biyokimyasal özelliği
Sis	Transmembran	PDGF reseptör analogu
Erb B	Transmembran	Trozin protein kinaz
Src	plazma membranı	Trozin protein kinaz
ras	plazma membranı	GTP az
fos	nükleus	Transkripsiyon faktör AP-1
mos	sitoplazma	Serin-treonin kinaz
raf	sitoplazma	Serin-treonin kinaz
myc	nükleus	DNA'ya bağlanır
myb	nükleus	DNA'ya bağlanır
Erb A	nükleus	Troid, steroid reseptör analogu

Büyüme faktörü gibi davranabilme yeteneğine sahip olan onkoproteinlerin, insülin ve epidermal büyüme faktör reseptörlerine bağlandığında trozin kinaz enziminin aktive olduğu ve bir dizi proteinin fosforile olduğu bilinir. Bununla beraber aktive olmuş onkogenlerin kodladığı kinazlar büyüme faktörlerinin mevcut olup olmamasına bakmaksızın sürekli hedeflerini fosforile ederler(28). Kısacası onkoproteinler, hücrede yapısal ve fonksiyonel enzimlerin özelliklerinin düzenlenmesinde rol oynayan, fosforilasyon ve defosforilasyon gibi işlemleri doğrudan veya dolaylı olarak katalizleyebilen kinazlar rolündedir(29-31).

AMAÇ

Kazein kinaz II'nin, hücrede bazı endojen substratları ve kazeini fosforile ettiği ileri sürülmektedir. Sunulan çalışmada rat akciğer sitozolünden izole edilen kazein kinaz II'nin otofosforilasyonu, değişik aktivatör ve inhibitörler varlığında gösterdiği aktivasyon ve inhibisyon ile bazı onkoproteinleri substrat olarak kullanıp kullanamayacağı araştırıldı ve elde edilen bulgular sunulan kaynakların ışığı altında tartışıldı.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Araç ve Gereçler:

Çalışma, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi deney hayvanları laboratuvarından alınan rat akciğeri kullanılarak yapıldı. Kazein, 2-merkaptoetanol, poli-L-lizin, poli-L-ornitin, spermin, spermidin, dekstran sülfat, guanozin 5'-trifosfat, amonyum persülfat, TEMED (N,N,N', N'-tetrametiletilediamin), (Tris (hidroksi metil) aminoetan), akrilamid, NN'-metilenbisakrilamid, sodyum dodesil sülfat (SDS), magnezyum asetat, mangan klorür, etilendiaminotetraasetik asit (EDTA), brom fenol mavisi, coomassie brillant blue R250 SİGMA Chemical CO, St Louis USA Firmasından, trikloroasetik asit (TCA), naftalin ve 1,4-dioxan MERCK AG, Darmstad Germany Firmasından, 2,5-difeniloxazol (PPO) ve 1,4-di-[2-(5-feniloxazolil)]-benzen (POPOP) BDH chemicals Ltd poole England Firmasından, Sephadex G25 PHARMACIA Fine Chemicals, Uppsala Sweden Firmasından, Guanozin 5'-[$\gamma^{32}\text{P}$] trifosfat (3000 ci/mmol) Amersham International plc, Buckinghamshire England Firmasından alındı.

Santrifüj olarak Sorwall Model SS-3 Santrifüjü ve mikrosantrifüj olarak Heraeus Biofüjü kullanıldı. Örneklerin radyoaktivitesi ise LKB Wallac 1209 Rach Beta sıvı sintilasyon sayacında okundu SDS poliakrilamid jel elektroforezi, Vertical Slab Gel Unit SE 600 Hoefer Scientific Instruments (HSI) San Francisco USA Firmasından alınan elektroforez cihazında yapıldı.

Yöntemler:

Dokunun alınışı ve Homojenatın Hazırlanışı:

Aldığımız taze 1.2 gr rat akciğer dokusunu küçük parçalara bölüp ağırlığının 2 katı hacmindeki 0.1 M pH 7.5 Tris-HCl tamponu (Tampon A) içinde cam teflon homojenizatörle homojenize edildi. Bu işlemler 0-4°C arasında gerçekleştirildi. Homojenat Sorwall Santrifüjünde 18000 rpm de 60 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant alınıp yaklaşık 2 ml'si Sephadex G-25 kolonundan (1x7.5 cm) geçirildi. Kolonun yıkama işlemi tampon A ile yapıldı. Akış hızı 48ml/saat'e ayarlandı. Bu şekilde enzim, küçük molekül ağırlıklı proteazlar ve siklik nükleotidlerden arındırıldı.

Enzim Aktivitesi Tayini:

Çalışmalarımızda, endojen poliamin bağımlı kazein kinaz II'nin aktivitesi bazı aktive ve inhibe edici bileşikler varlığında ölçüldü. Bunun için dışarıdan fosfat vericisi olarak [$\gamma^{32}\text{P}$] ATP ve [$\gamma^{32}\text{P}$] GTP kullanıldı. Yukarıda anlatıldığı şekilde elde edilen enzimin, işaretli fosfatı kullanarak fosforile ettiği proteinlerin verdiği radyoaktivitenin ölçümüyle enzim aktivitesi tayin edildi. Bu deneylerde heparin ve dekstran sulfat gibi inhibitörler, spermin, spermidin, polilizin ve poliornitin gibi aktivatörler ve substrat olarak ekzojen kazein ve onkoproteinler kullanıldı. Her tayin için kullandığımız kokteyl karışımı toplam 250 μl idi ve 20 mM Tris-HCl tamponu (pH 7.5) içinde 2.5 μmol magnezyum asetat (yada mangan klorür) ve 0.02 nmol [$\gamma^{32}\text{P}$] GTP (ya da [$\gamma^{32}\text{P}$] ATP) (10^7 cpm/nmol) içermekteydi.

Deneylerimizde aktivatör inhibitör ve kazeinin miktarları 10 µl enzimin ise 20 µl, olarak kullanıldı. Değişik protokolde hazırlanan her bir mikrotüp aşağıdaki işlemlerden geçirildi:

Protokole göre karışıma 0' dakikada 200 µl kokteyl karışımından ilave edildi ve karışım 37°C su banyosunda 10 dakika bekletildi. Reaksiyonu durdurmak için 1 ml %10 soğuk triklorasetikasit (TCA) eklendi ve karışım 11 000 rpm'de 15 dakika mikrofüjde santrifüj edildi. Mikrosantrifügasyon ile oluşan çökelti 1 ml %10 soğuk TCA ile tekrar yıkandı ve yine santrifüjlendi. Yıkanan çökelti 0.5 ml 1N NaOH içerisinde çözüldü ve çözüntü 3 ml dioksan çözeltisine (%1 PPO, %0.025 POPOP, %20 naftalin, dioksan) eklendi. Sonradan β-sintilasyon sayacında radyoaktif ölçümü yapıldı.

SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi:

SDS poliakrilamid jel elektroforezinde iki farklı yüzdede jel hazırlandı. Separating jel (ayırıcı kısım) hazırlanışı; 1.5 M Tris-HCl tamponu pH 8.8 tamponu %0.03 SDS, %1 bisakrilamid, %37.5 akrilamid stok çözeltilerinden %10 olacak şekilde hazırlandı. Jelin polimerizasyonu için %10 APS ve TEMED ilave edildi. Jel 15x20x0.5 cm boyutlarındaki iki cam tabaka arasında hazırlandı. Stacking jel ise 0.5M Tris-HCl tamponu (pH 6.8) %0.03 SDS, %1 bisakrilamid, %37.5 akrilamiddan %4 olacak şekilde hazırlandı. Elektrofez tamponu olarak ise 50 mM Tris, 380 mM glisin pH 8.9 tamponu kullanıldı.

Jele uygulanacak örnek 100 µl 0.5 M Tris içerisinde 50 µl %0.3 SDS, 12 µmol 2 merkaptetanol, %0.003 brom fenol mavisi ve %1 sukroz karışımına eklenerek kaynak su banyosunda 3-5 dakika bekletildi. Örnekler soğutulduktan sonra jele uygulandı. 200 V'da jel yürütüldü ve 15 cm yürütüldükten sonra jel çıkarılıp 0.25 cm uzunluğunda kolonlara ayrıldı. Bu parçalar enzim aktivitesi tayininde olduğu gibi dioksan çözeltisine eklendi ve radyoaktivite ölçümleri yapıldı.

BULGULAR

Tris-HCl Tamponu (pH 7.5) İçerisinde Kazein Kinaz II Aktivasyonu:

Tris-HCl tamponu (pH 7.5) içerisinde fosfat vericisi olarak [$\gamma^{32}\text{P}$] GTP kullanılarak, Mg^{++} ve Mn^{++} içeren ortamlarda kazein kinaz II aktiviteleri ölçüldü. Mn-GTP ve MgGTP 'nin fosfat vericisi olduğu ortamlarda kazein kinaz II aktivitesi dekstran sülfat ile %70-80 arasında inhibe edilirken, poliaminler ile aktivitesi 4-5 kat arttı. Ekzojen substrat kazein ilavesinde ise enzim dekstran sülfatla %70-90 arasında inhibe olurken, poliaminlerle aktivitesindeki artış 2-3 kat kadardır (Tablo II).

Fosfat Tamponu (pH 7.5) İçerisinde Kazein Kinaz II Aktivitesi:

Fosfat tamponu (pH 7.5) içerisinde Mg-GTP fosfat vericisi olarak kullanıldığında, kazein kinaz II aktivitesi Tris-HCl tamponunda gözlenen değerlerden daha yksekdi. Yine dekstran sülfat ile kuvvetli bir inhibisyon gözlenirken, poliaminlerle değişik düzeylerde aktivasyonlar gözlendi (Tablo III).

TABLO II: pH 7.5 Tris-HCL tamponu ve GTP varlığında Mg^{++} ya da Mn^{++} içeren ortamlarda poliaminlerin kazein kinaz II aktivitesi üzerindeki etkisi. Deney ortamına 10 μ g poliamin ilave edilmiş ve aktivitelere dpm olarak verilmiştir.

	Sadece Enzim	Enzim + Dekstran Sülfat	Enzim + aktivatör	Enzim + aktivatör + dekstran sülfat	Enzim + kazein	Enzim + kazein + dekstran sülfat	Enzim + Kazein + Aktivatör	Enzim + Kazein + Aktivatör + Dekstran Sülfat
Mg-polilizin	565	154	2315	612	1476	619	2468	867
Mg-poliornitin	437	137	2101	709	1357	624	2133	717
Mg-spermin	573	142	2335	599	1276	587	2297	835
Mg-spermidin	505	125	2415	607	1393	661	2632	812
Mn-polilizin	705	457	2225	1167	1238	975	2396	1137
Mn-poliornitin	896	499	2138	925	1307	748	2291	111
Mn-spermin	807	532	2096	997	1198	868	2321	1274
Mn-spermidin	742	556	2011	1059	9227	983	2450	1134

TABLO III: pH 7.5 fosfat tamponu ve GTP varlığında Mg^{++} içeren ortamda poliaminlerin kazein kinaz II aktivitesi üzerindeki etkisi. Deney ortamına 10 μ g poliamin ilave edilmiş ve aktiviteler dpm olarak verilmiştir.

	Sadece Enzim	Enzim + Dekstran Sülfat	Enzim + aktivatör	Enzim + aktivatör + dekstran sülfat	Enzim + kazein	Enzim + kazein + dekstran sülfat	Enzim + Kazein + Aktivatör	Enzim + Kazein + Aktivatör + Dekstran Sülfat
Mg-polilizin	1076	878	5117	2317	2333	2007	5644	2557
Mg-poliornitin	913	794	4388	2101	2109	1897	5179	2433
Mg-spermin	900	798	4525	2265	228	1903	5112	2397
Mg-spermidin	947	785	4813	2558	217	2276	5138	1986

Kazein Kinaz II Aktivitesine GTP İçeren Ortamda, Na⁺ İyonunun Etkisi:

Mg-GTP varlığında Tris-HCl tamponu (pH 7.5) içeren ortamlarda yapılan çalışmalarda rat akciğeriinden elde edilen enzimin aktivitesini Na⁺ iyonunun çok az miktarda inhibe ettiği gözlendi (Tablo IV).

ATP İçeren Ortamlarda Kazein Kinaz II Aktivitesi:

Mg-ATP'yi fosfat vericisi olarak kullandığımız deneylerde dekstran sülfat ile oluşan inhibisyonunun daha az (%20-50) olduğu gözlendi. Poliaminlerin yarattığı aktivasyonun ise 2-3 kat arttığı saptandı. Ayrıca ATP ile enzimin gösterdiği aktivasyon GTP varlığında görülen aktivasyondan daha fazlaydı (Tablo V).

Kazein kinaz II Aktivitesine ATP İçeren Ortamda Na⁺ İyonunun Etkisi:

Mg-ATP, dekstran sülfat ve poliaminlerin varlığında enzim zerine Na⁺'un etkisi, enzimin Mg-GTP'li ortamda Na⁺ iyonu ile verdiği inhibisyona benzer şekilde minimal düzeyde saptandı (Tablo VI).

TABLO IV: pH 7.5 Tris-HCL tamponu ve GTP varlığında 1 mM NaCl'ün kazein kinaz II aktivitesi üzerine etkisi (dpm). Deney ortamına 10 µg poliamin ilave edilmiş ve aktiviteler dpm olarak verilmiştir.

	Sadece Enzim	Enzim + Dekstran Sülfat	Enzim + aktivatör	Enzim + aktivatör + dekstan sülfat	Enzim + kazein	Enzim + kazein + dekstran sülfat	Enzim + Kazein + Aktivatör	Enzim + Kazein + Aktivatör + Dekstran Sülfat
Mg-polilizin	680	201	2511	677	1344	589	2677	722
Mg-poliornitin	551	187	2607	781	1255	652	2809	821
Mg-spermin	695	169	2686	673	1400	539	2713	698
Mg-spermidin	529	227	2587	642	1367	595	2877	745

TABLO V: pH 7.5 Tris-HCL tamponu ve ATP varlığında Mg^{++} içeren ortamda poliaminlerin kazein kinaz II aktivitesi üzerindeki etkisi. Deney ortamına 10 μ g poliamin ilave edilmiş ve aktiviteler dpm olarak verilmiştir.

	Sadece Enzim	Enzim + Dekstran Sülfat	Enzim + aktivatör	Enzim + aktivatör + dekstan sülfat	Enzim + kazein	Enzim + kazein + dekstran sülfat	Enzim + Kazein + Aktivatör	Enzim + Kazein + Aktivatör + Dekstran Sülfat
Mg-polilizin	1056	687	2511	987	2186	1174	2726	1328
Mg-spermin	908	856	2418	1177	1998	974	2955	1253
Mg-spermidin	1066	731	2699	1058	2056	968	3012	1185

TABLO VI: pH 7.5 Tris-HCL tamponu ve ATP varlığında NaCl'ün kazein kinaz II aktivitesi üzerine etkisi. Deney ortamına 10µg poliamin ilave edilmiş ve aktiviteler dpm olarak verilmiştir.

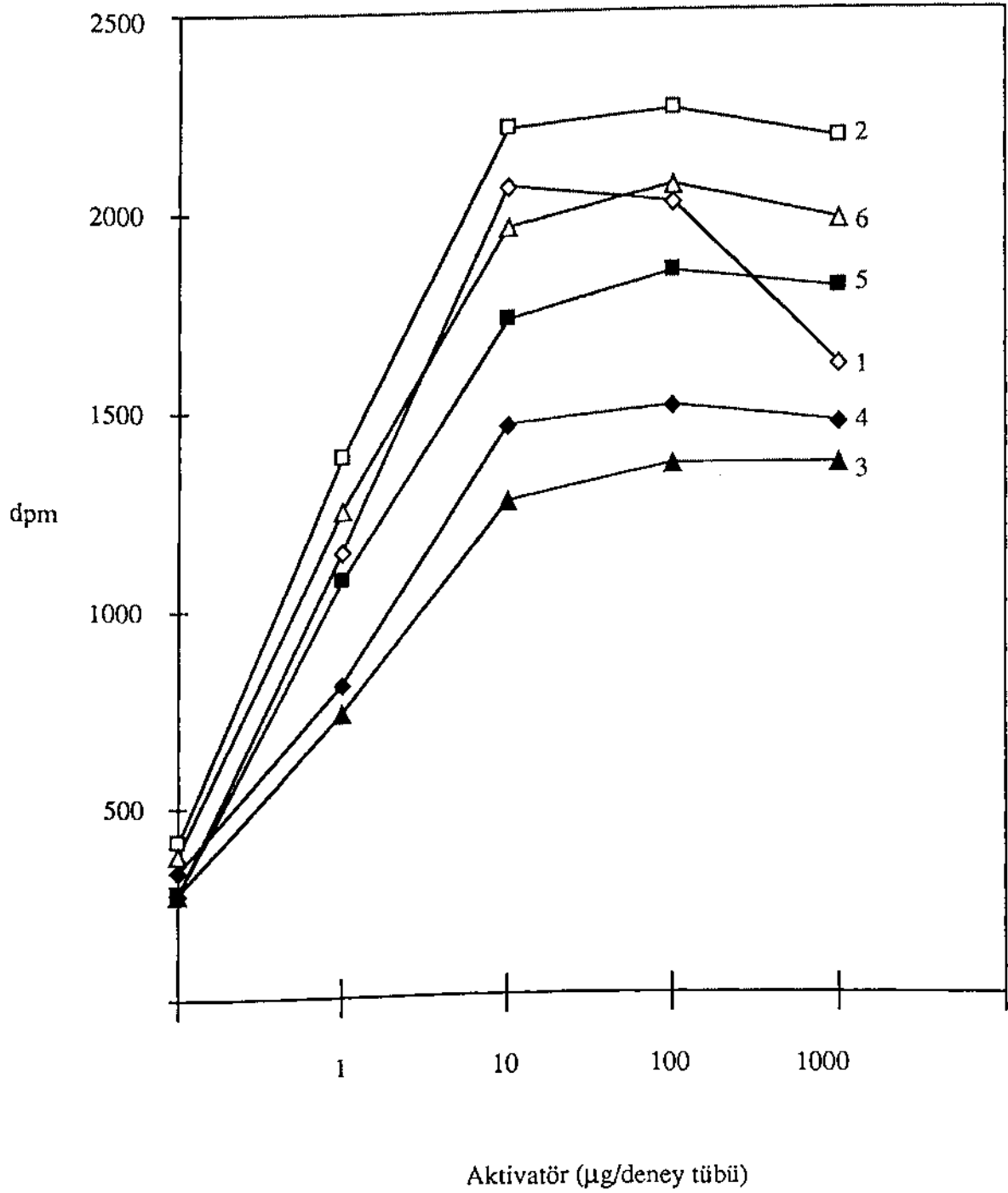
	Sadece Enzim	Enzim + Dekstran Sülfat	Enzim + aktivatör	Enzim + aktivatör + dekstan sülfat	Enzim + kazein	Enzim + kazein + dekstran sülfat	Enzim + Kazein + Aktivatör	Enzim + Kazein + Aktivatör + Dekstran Sülfat
Mg-polilizin	1116	557	2399	928	2207	1064	2588	1221
Mg-poliornitin	1073	796	2512	877	2135	992	2753	1062
Mg-spermin	1104	881	2574	1320	2338	1151	2659	1167
Mg-spermidin	997	683	2741	1255	2477	989	2994	1404

Değişik Konsantrasyonlardaki Poliaminlerin Kazein Kinaz II Aktivitesi Üzerine Etkileri:

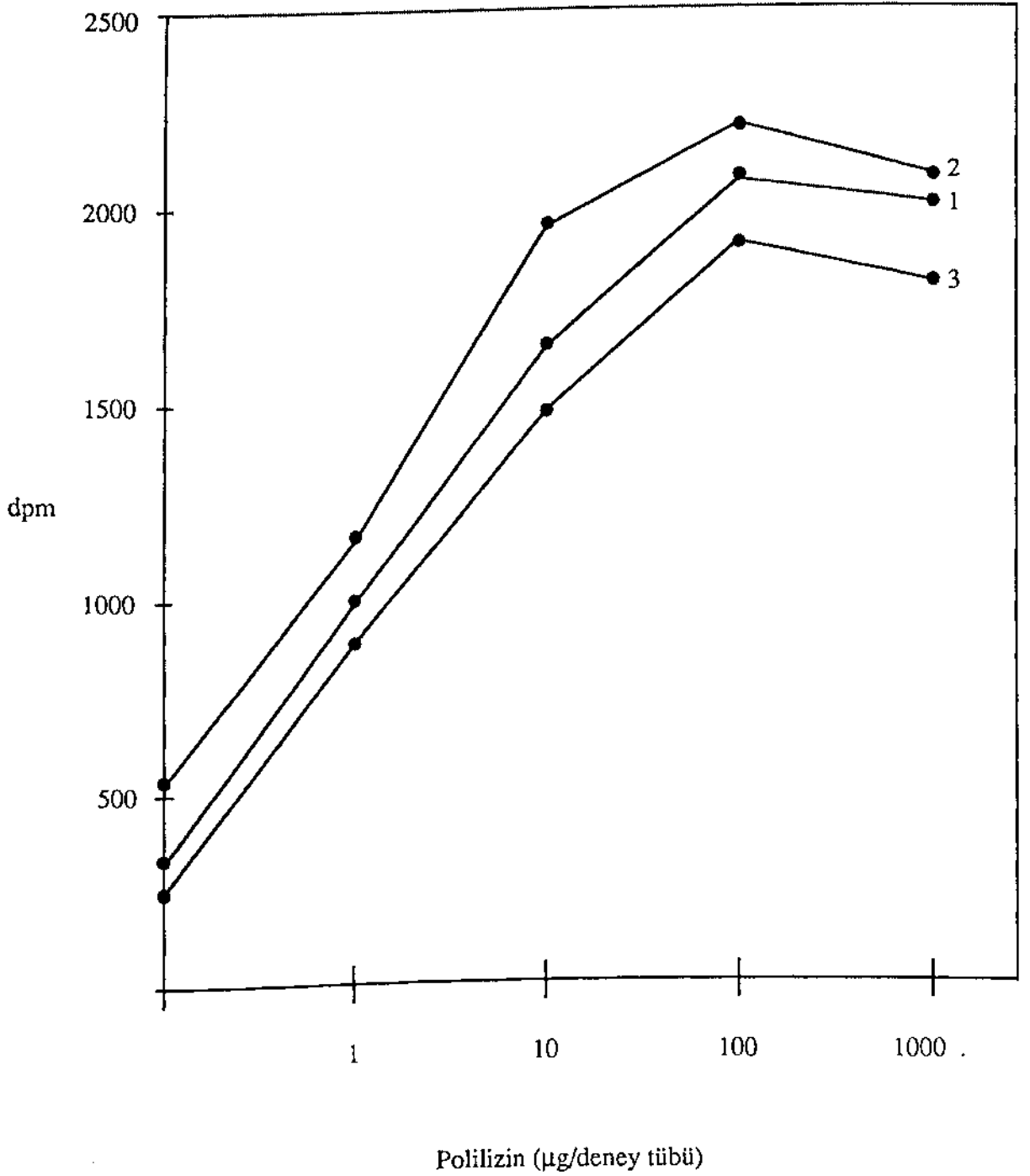
Kazeinli veya kazeinsiz ortamlarda polilizin, spermin ve spermidinle kazein kinaz II aktivitesinin 3-5 kat arttığı ve poliaminler arasında en yüksek enzim aktivasyonunun polilizin tarafından sağlandığı gözlemlendi (Şekil 2).

a) Aktivasyonda en yüksek değer deney ortamında 100 µg polilizin bulunduğu zaman elde edildi ve ayrıca Mn^{++} li ortamlardaki aktivasyon değerinin Mg^{++} 'li ortamda görülen aktivasyondan biraz daha fazla olduğu saptandı. Na^+ iyonunun enziminin önemli derecede inhibe etmediği gözlemlendi (Şekil 3).

b) Poliornitin maksimum aktivasyona yol açtığı konsantrasyon deney ortamı başına 10 µg poliornitindir. Mg^{++} ve poliornitin ile oluşan aktivasyon, Mn^{++} ile gözlenenenden daha yüksekti. Na^+ ile oluşan inhibisyonun da önemli olmadığı gözlemlendi (Şekil 4).

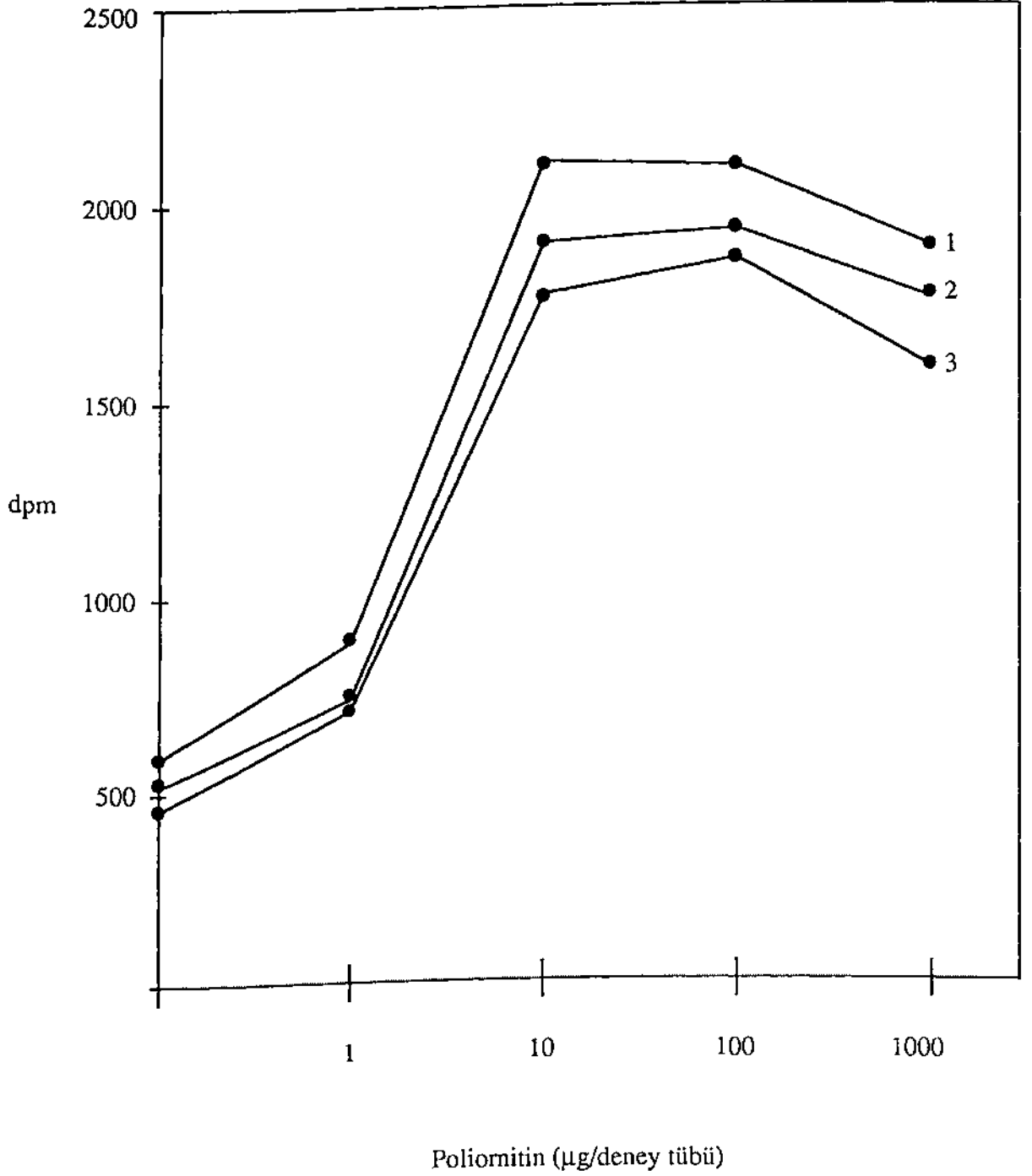


Şekil 2 : 37°C'de pH 7.5. Tris-HCL tamponu ve Mg^{++} + $[^{32}P]$ GTP varlığında değişik aktivatör konsantrasyonlarının endojen substratlar ve kazein üzerine olan etkileri $\diamond$ 1 : enzim + polilizin, $\square$ 2: enzim+ polilizin + kazein, $\blacktriangle$ 3 : enzim + spermin, $\blacklozenge$ 4 : enzim + spermin + kazein, $\blacksquare$ 5 : enzim + spermidin, $\triangle$ 6 : enzim + spermidin + kazein.



Şekil 3 : 37°C'de pH 7.5. Tris-HCL tamponu ve $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ GTP varlığında değişik polilizin konsantrasyonlarının, değişik kofaktörler ve Na^+ yonu içeren ortamlardaki endojen substrat fosforilasyonu üzerine olan etkileri.

1 : Mg^{++} , 2 : Mn^{++} , 3 : $\text{Mg}^{++} + \text{Na}^+$

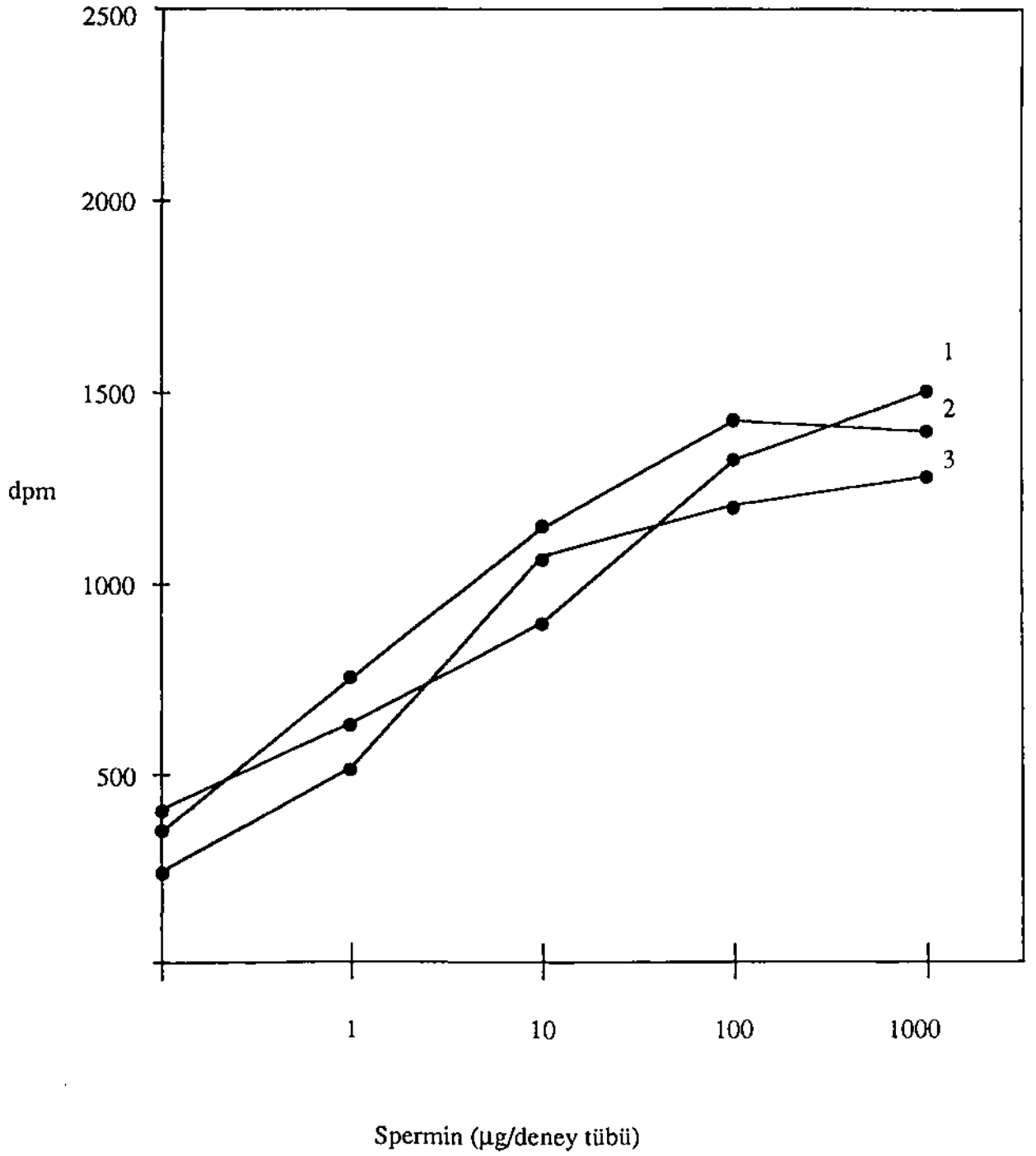


Şekil 4 : 37°C'de pH 7.5. Tris-HCL tamponu ve [γ - 32 P] GTP varlığında değişik poliornitin konsantrasyonlarının, değişik kofaktörler ve Na⁺ iyonu içeren ortamlardaki endojen substrat fosforilasyonu üzerine olan etkileri.

1 : Mg⁺⁺, 2 : Mn⁺⁺, 3 : Mg⁺⁺ + Na⁺

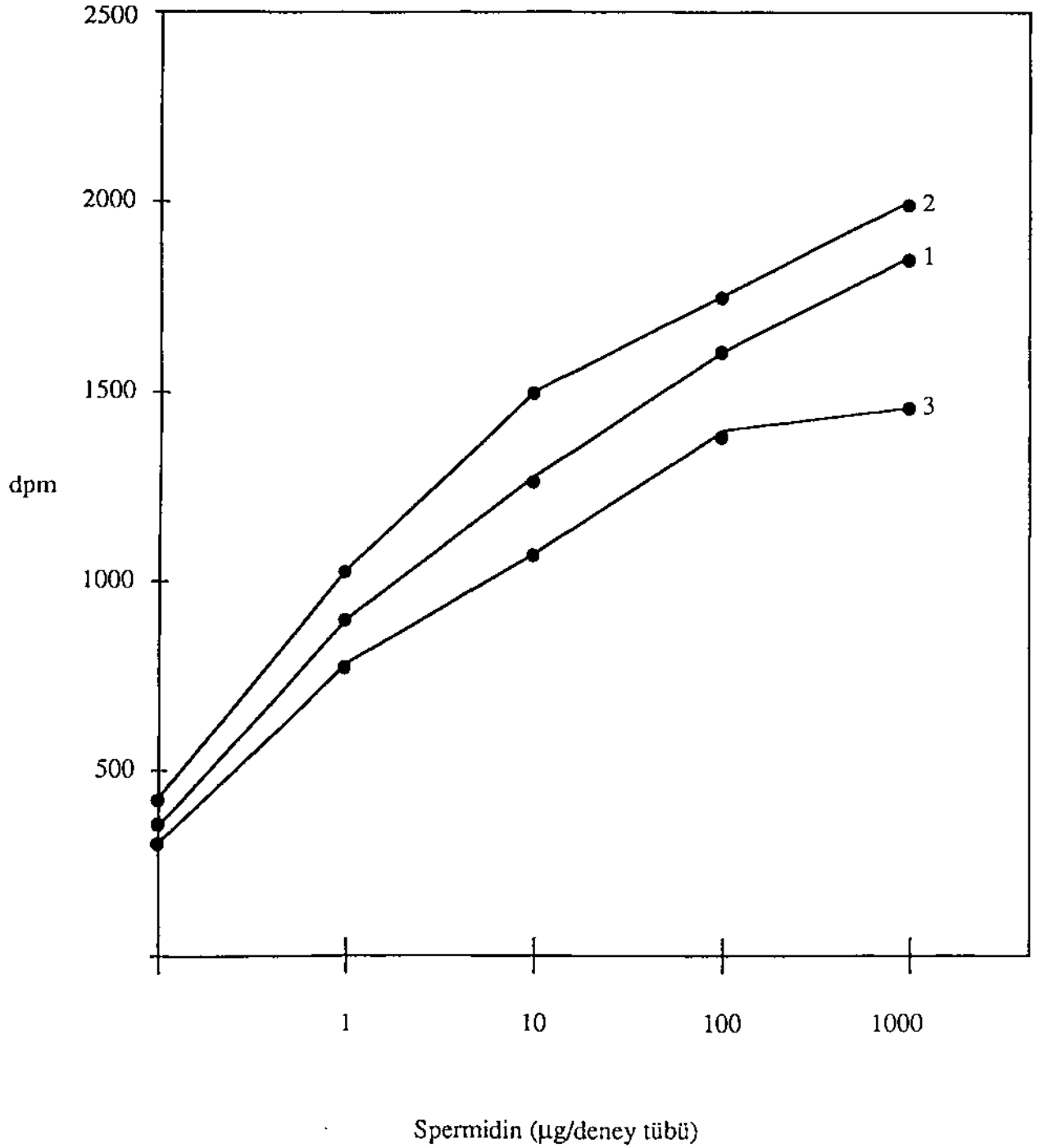
c) Sperminin maksimum aktivasyonu deney ortamı başına 100 μg kullanıldığında gözlemlendi. 1000 μg spermin konsantrasyonu haricinde, Mn^{++} iyonu iye elde edilen aktivasyonun Mg^{++} iyonuna göre daha fazla olduğu saptandı. Na^+ iyonunun inhibisyon etkisi ise daha önce belirtildiği gibi önemli değildi (Şekil 5).

d) Spermidinin en yüksek aktivasyonu deney ortamı başına 1000 μg spermidinle elde edilirken, Mn^{++} lu ortamlarda aktivasyon Mg^{++} 'lu olanlara göre daha yüksek bulundu ve özellikle 1000 μg spermidin konsantrasyonunda gözlenen dekstran sulfat inhibisyonunun daha fazla olduğu saptandı. Bu konsantrasyonda Na^+ iyonunun inhibisyon etkisi diğer konsantrasyonlarda gözlenenden daha fazlaydı (Şekil 6).



Şekil 5 : 37°C'de pH 7.5. Tris-HCL tamponu ve [γ^{32} P] GTP varlığında değişik spermin konsantrasyonlarının, değişik kafaktörler ve Na⁺ iyonu içeren ortamlardaki endojen substrat fosforilasyonu üzerine olan etkileri.

1 : Mg⁺⁺, 2 : Mn⁺⁺, 3 : Mg⁺⁺ + Na⁺



Şekil 6 : 37°C'de pH 7.5. Tris-HCL tamponu ve [$\gamma^{32}\text{P}$] GTP varlığında değişik spermidin konsantrasyonlarının, değişik kofaktörler ve Na^+ iyonu içeren ortamlardaki endojen substrat fosforilasyonu üzerine olan etkileri.

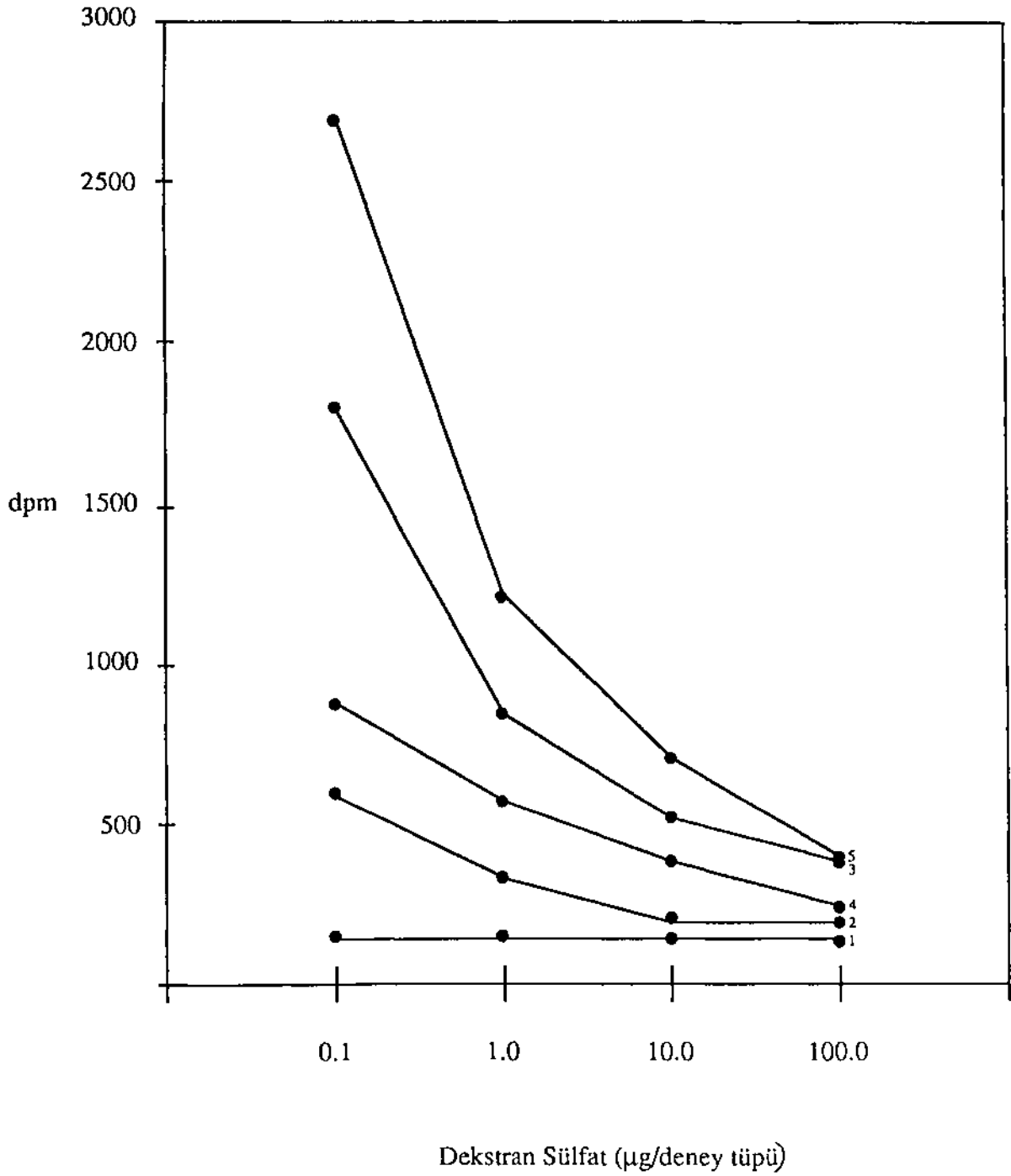
1 : Mg^{++} , 2 : Mn^{++} , 3 : $\text{Mg}^{++} + \text{Na}^+$

Kazein Kinaz II Enziminin Değişik Konsantrasyonlarda Dekstran Sülfat ve Heparin ile İnhibisyonu:

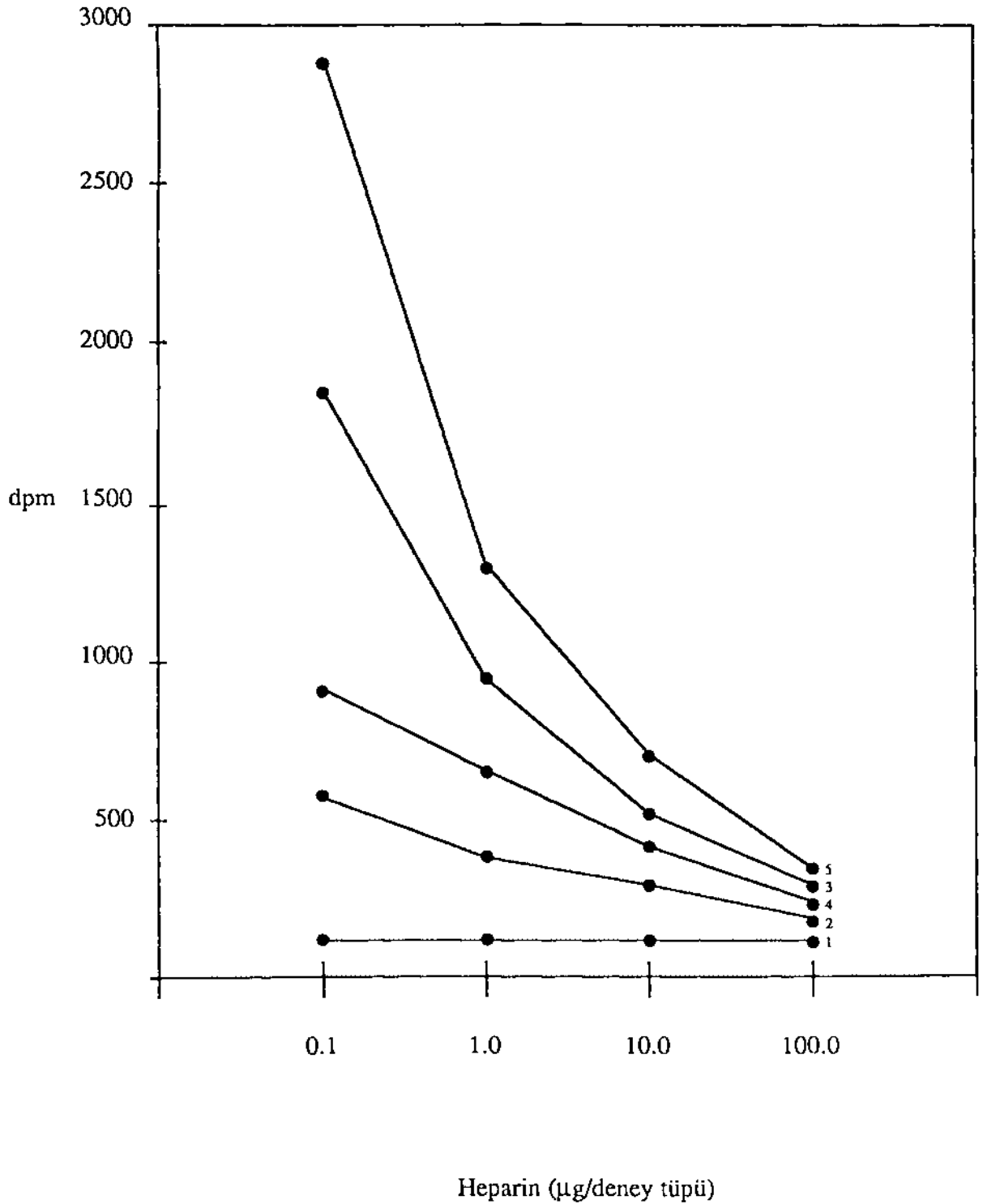
En yüksek inhibisyon deney ortamı başına 100 µg dekstan sülfat ve 100 µg heparin konsantrasyonlarında görüldü. Bu konsantrasyonlarda %80-90 arası inhibisyon elde edildi. Ayrıca her iki inhibitörün de konsantrasyonu ile inhibisyon arasında doğru bir orantı vardı (Şekil 7,8).

pH'in Kazein Kinaz II Aktivitesine Etkisi:

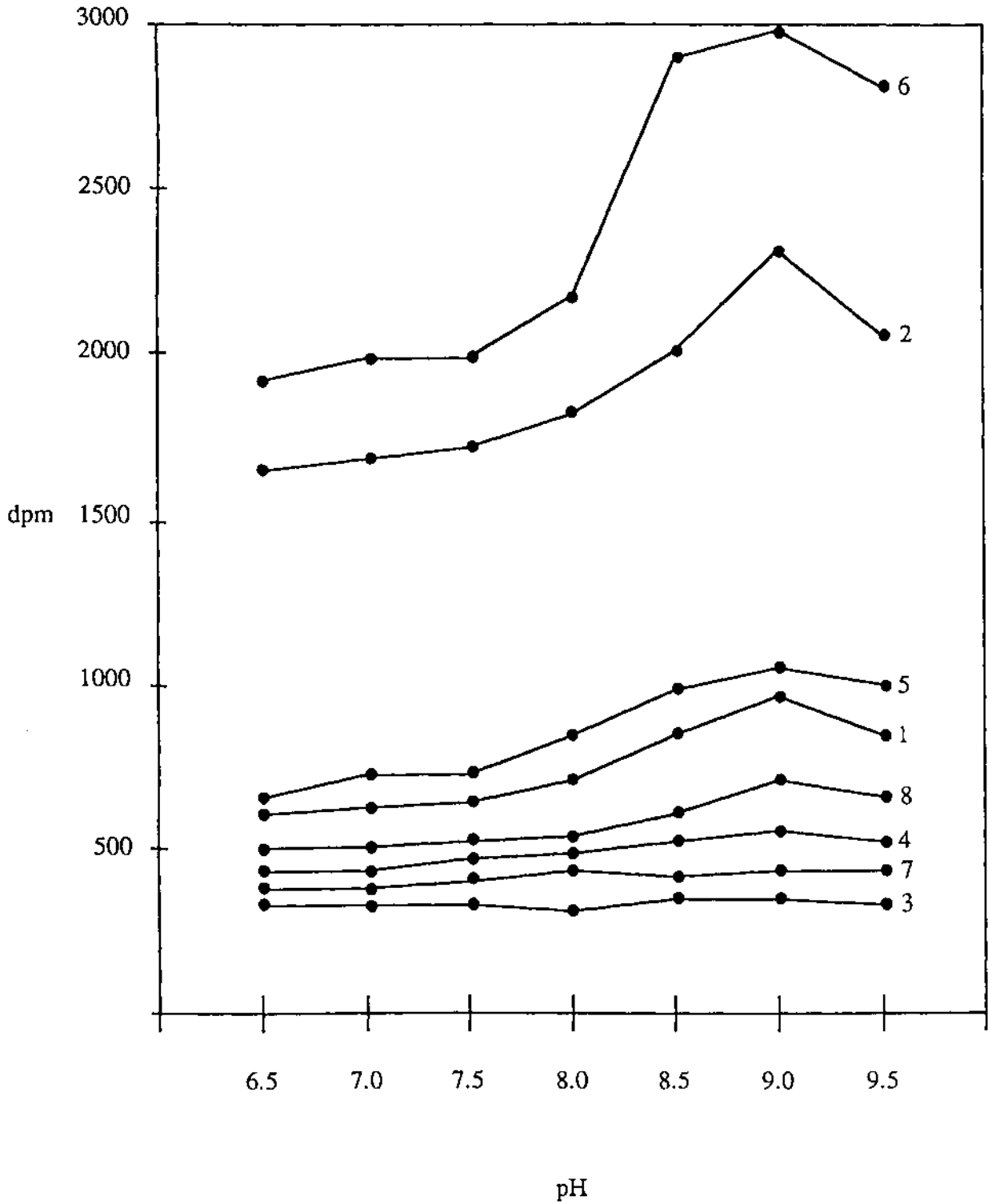
Poliaminlerin ve dekstran sülfatın varlığında veya yokluğunda enzim aktivitesi ile pH arasında grafikler çizildi ve sonuçta en yüksek aktivasyona pH 9.0'da rastlandı. Poliaminlerin yokluğunda aktivite eğrisinin düz plato şeklinde olduğu, polilizinli ortamlarda ise pH 8.5 ile pH 9.0 arasında aktivitenin en yüksek olduğu gözlemlendi (Şekil 9).



Şekil 7 : 37°C'de pH 7.5. Tris-HCL tamponu ve $[\gamma^{32}P]$ GTP varlığında değişik dekstran sülfat konsantrasyonlarının, substrat fosforilasyonu üzerine olan etkileri. 1 : Kontrol (enzimsiz), 2 : Sadece enzim, 3 : enzim + polilizin, 4 : Enzim + kazein, 5 : Enzim+kazein+polilizin.



Şekil 8 : 37°C'de pH 7.5 Tris-HCL tamponu ve Mg^{++} , $[^{32}P]$ GTP varlığında değişik heparin konsantrasyonlarının, endojen substratlar ve kazein üzerine olan etkileri. 1 : Kontrol (enzimsiz), 2 : Sadece enzim, 3 : enzim + polilizin, 4 : Enzim + kazein, 5 : Enzim+kazein+polilizin.



Şekil 9 : 37°C'de pH 7.5. Tris-HCL tamponu ve Mg^{++} $[\gamma^{32}P]$ GTP varlığında, endojen substratlar ve kazein için pH değişimi. 1 : sadece enzim, 2 : enzim+polilizin, 3 : Enzim+dekstran sülfat, 4 : Enzim + polilizin + dekstran sülfat, 5 : enzim+kazein, 6 : enzim+kazein+polilizin, 7 : enzim+kazein+dekstran sülfat, 8 : enzim+kazein+polilizin+dekstran sülfat

Kazein Kinaz II'nin Natif Substratlarının SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezinde Tayini:

a) GTP varlığında yapılan çalışma:

Substratların yokluğunda enzim ile fosforile edilmiş iki jel segmentine rastlanıldı. Her iki segmentte de dekstran sülfat ilavesi radyoaktivitenin azalmasına yol açtı. Polilizin ilavesi 31 ve 33. segmentlerin her ikisinde de radyoaktiviteyi arttırdı. Ayrıca 34. segmentte üçüncü bir radyoaktiviteye yol açtı. Dekstran sülfat ilavesi 34. segmentteki radyoaktivitenin tamamen kaybolmasına neden oldu. Kazein varlığında ise dört segmentte de radyoaktiviteye rastlandı. Bunlar 22, 31, 33 ve 34. segmentte olup dekstran sülfat ilavesiyle radyoaktivitenin düştüğü, polilizin ilavesiyle yükseldiği gözlemlendi. Kazeinsiz ortamdaki radyoaktiviteden farkı sadece 22. segmentte protein içermesidir (Tablo VII).

TABLO VII: Kazein kinaz II için natif substratların SDS-PAGE ile analizi. Fosfat vericisi olarak GTP, aktivatör olarak polilizin kullanıldı.

		Sadece Enzim	Enzim + Dekstran Sülfat	Enzim + aktivatör	Enzim+ aktivatör + dekstan sülfat	Enzim + kazein	Enzim+ kazein+ dekstran sülfat	Enzim + Kazein + Aktivatör	Enzim+ Kazein+ Aktivatör+ Dekstran Sülfat
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0	0
	7	0	0	0	0	0	0	0	0
	8	0	0	0	0	0	0	0	0
	9	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	0	0	0	0	0	0	0	0
	11	0	0	0	0	0	0	0	0
	12	0	0	0	0	0	0	0	0
	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	14	0	0	0	0	0	0	0	0
	15	0	0	0	0	0	0	0	0
	16	0	0	0	0	0	0	0	0
	17	0	0	0	0	0	0	0	0
	18	0	0	0	0	0	0	0	0
	19	0	0	0	0	0	0	0	0
	20	0	0	0	0	0	0	0	0
	21	0	0	0	0	0	0	0	0
	22	0	0	0	0	456	148	1179	227
	23	0	0	0	0	0	0	0	0
	24	0	0	0	0	0	0	0	0
	25	0	0	0	0	0	0	0	0
	26	0	0	0	0	0	0	0	0
	27	0	0	0	0	0	0	0	0
	28	0	0	0	0	0	0	0	0
	29	0	0	0	0	0	0	0	0
	30	0	0	0	0	0	0	0	0
boya ile işaretli	31	532	101	1157	226	635	143	679	194
	32	0	0	0	0	0	0	0	0
	33	315	65	427	258	378	96	451	201
	34	0	0	466	0	118	105	132	68
	35	0	0	0	0	0	0	0	0
	36	0	0	0	0	0	0	0	0

b) ATP varlığında yapılan çalışma:

Substratların yokluğunda enzimin fosforile ettiği proteinler sadece iki segmentte izlendi. 31 ve 33. segmentlere dextran sülfat ilavesi her iki segmentte de radyoaktivitenin düşmesine yol açtı. Tersine polilizin ilavesiyle yedi ayrı segmentte radyoaktiviteye rastlandı. Bu segmentler sırasıyla 23, 25, 27, 28, 31, 33 ve 35. segmentlerdir. Dekstran sülfat ilavesinde ise 31, 33 ve 35. segmentlerde %50-75 arasında bir düşme, diğer segmentlerde ise radyoaktiviteye rastlanmadı. Ekzojen substrat olan kazein ilavesinde ise 22, 31, 33. segmentlerde radyoaktivite gözlemlendi, fakat yine diğerleri gibi dekstran sülfat ilavesinde her üç segmentte de %60-75 arasında bir düşme kaydedildi. Polilizin ilavesinde ise bu üç segmentte 2-4 kat civarında bir artış gözlemlendi (Tablo VIII).

TABLO VIII: Kazein kinaz II için natif substratların SDS-PAGE ile analizi.
Fosfat vericisi olarak ATP aktivatör olarak polizin kullanıldı.

		Sadece Enzim	Enzim + Dekstran Sülfat	Enzim + aktivatör	Enzim+ aktivatör + dekstran sülfat	Enzim + kazein	Enzim+ kazein+ dekstran sülfat	Enzim + Kazein + Aktivatör	Enzim+ Kazein+ Aktivatör+ Dekstran Sülfat
	1	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0	0
	7	0	0	0	0	0	0	0	0
	8	0	0	0	0	0	0	0	0
	9	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	0	0	0	0	0	0	0	0
	11	0	0	0	0	0	0	0	0
	12	0	0	0	0	0	0	0	0
	13	0	0	0	0	0	0	0	0
	14	0	0	0	0	0	0	0	0
	15	0	0	0	0	0	0	0	0
	16	0	0	0	0	0	0	0	0
	17	0	0	0	0	0	0	0	0
	18	0	0	0	0	0	0	0	0
	19	0	0	0	0	0	0	0	0
	20	0	0	0	0	0	0	0	0
	21	0	0	0	0	0	0	0	0
	22	0	0	0	0	967	425	1474	672
	23	0	0	75	0	0	0	0	0
	24	0	0	0	0	0	0	0	0
	25	0	0	101	0	0	0	0	0
	26	0	0	0	0	0	0	0	0
	27	0	0	69	0	0	0	0	0
	28	0	0	82	0	0	0	0	0
	29	0	0	0	0	0	0	0	0
	30	0	0	0	0	0	0	0	0
boya ile işaretli	31	1098	418	1392	627	983	376	1391	397
	32	0	0	0	0	0	0	0	0
	33	211	134	344	178	355	175	432	201
	34	0	0	0	0	0	0	0	0
	35	0	0	1228	452	0	0	0	0
	36	0	0	0	0	0	0	0	0

Kazein Kinaz II'nin Onkoprotein Substratları:

Kazein Kinaz II'nin substratları olabilecek onkoproteinler üzerine aktivatör, inhibitör ve ekzojen substrat olan kazeinin etkileri araştırıldı. Myc onkoproteini, myb onkoproteini ve kazein ilavesinde enzim aktivasyonu 2-3 kat artış gösterdi. Bu artış polilizin ilavesiyle 4-5 katlık bir değere yükseldi. Dekstran sülfat ilavesiyle her deney için %50-75 arası bir inhibisyon gözlemlendi. Src ve ras onkoproteinleri için bulunan değerler ise büyük bir değişim göstermedi. Yani enzimin myc ve myb onkoproteini üzerine olan etkisi, diğer iki onkoproteine göre daha farklıydı (Tablo IX).

Tablo IX: pH 7.5 Tris-HCl tamponu ve GTP varlığında enzimin onkoproteinler ve kazein üzerine etkisi (dpm). Deney ortamı başına 100 µg substrat ve 10 µg polilizin kullanıldı .

Sadece enzim	Enzim + substrat	Enzim + substrat + aktivatör	Enzim + substrat+ dekstran sülfat	Enzim + substrat + aktivatör + dekstran sülfat
+ Kazein 873	1532	2617	735	883
+ myc 835	2087	4892	771	915
+ myb 935	1994	4386	625	1066
+ src 881	1003	1218	704	776
+ ras 922	945	1053	649	772

TARTIŞMA

Yaptığımız çalışmada, rat akciğer homojenatından elde edilen kazein kinaz II aktivitesinin değişik şartlar altında, farklı fosfat vericileri, aktivatörler, inhibitörler, substratlar, onkoprotein substratlar, iyon kofaktörler ve tamponlar varlığında gösterdiği değişiklikler araştırıldı.

Rat akciğer kazein kinaz II'si poliamin bağımlı bir enzim olup poliamin gibi polikasyonik bileşiklerle aktive olur. Poliaminler içerisinde enzimi en fazla polilizinine aktive ettiği saptandı ve fosfat tamponu (pH 7.5) içeren ortamda Tris-HCl tamponuna göre daha iyi çalıştığı, Mn^{++} içeren ortamlarda da Mg^{++} içeren ortama göre daha aktif olduğu gözlemlendi (Tablo II, III).

Enzimin, endojen substrat üzerine olan fosforilasyon etkisine ilave olarak bir ekzojen substrat olan kazein ilavesiyle fosforilasyon hızının arttığı, doğal olarak fosfat tamponunda bu artışın daha da fazla olduğu gösterildi (Tablo II, III).

Enzimin myb, myc gibi onkoproteinleri substrat olarak kullanma yeteneği araştırıldı (Tablo IX). Bu onkoproteinlerin enzim tarafından fosforillenerek transforme hücrelerde, hücrenin aşırı çoğalmaya olan duyarlılığını artırdığı düşünölmektedir. Myc ve mby onkoproteinleri DNA'ya bağlanarak, hücrede artışa yönelik olayları hızlandırır (14).

Dışarıdan ekzojen ilave edilen radyoaktif işaretili ^{32}P taşıyan ATP veya GTP'li ortamlarda, rat akciğer kazein kinaz II aktivitesi ölçölerek, enzimin ATP varlığında daha aktif olduğu ve daha fazla fosfoprotein miktarına yol açtığı gösterildi (Tablo V).

Enzim üzerinde Na^+ iyonunun inhibitör etkisi araştırıldığında literatürde elde edilen bulgulara benzer bulgular elde edilemedi ve enzimin Na^+ 'a duyarsız olduğu, Na^+ 'un bu enzim için kuvvetli bir inhibitör olmadığı gösterildi (Tablo IV, VI) (15).

SDS-PAGE analizinde ise enzim tayininde olduğu gibi ATP'li ortamlarda enzimin daha fazla proteini fosforile ettiği gözlemlendi. GTP kullanılan elektroforezde enzim + aktivatör varlığında fosforile üç proteine rastlanmış iken, ATP kullanılan elektroforezde ise yedi fosfoproteine rastlanmıştır (Tablo VII, VIII).

Tris-HCl tamponu içerisinde enzim aktivitesinin pH 9.0'da en yüksek olduğu gözlemlendi. Bununla beraber bir çok doku için optimum pH 7.5 olarak saptandı (Şekil 9).

Bu sonuçlar kısmi olarak saflaştırdığımız enzimin özelliklerini göstermektedir. Dolayısıyla gerçek özelliklerini tayin etmek için enzimin tam anlamıyla saflaştırılması gerekir.

ÖZET

Çalışmamızda kullandığımız değişik tayin yöntemleriyle değişik şartlar altında rat akciğer kazein kinaz II'sine ait bazı özellikler incelendi.

Poliamin bağımlı protein kinazlar, ATP veya GTP'yi fosfat vericisi ve Mg^{++} veya Mn^{++} 'i, metal kofaktör olarak kullanarak değişik proteinlerin seril ve treonil amino asit kalıntılarını fosforile ederler.

Çalışmada, kazein kinaz II'nin poliamin ve polibazik peptidlerle aktive, dekstran sülfat, heparin ve polianyonik bileşiklerle inaktifte olduğu; Na^+ iyonu ile inhibe olmadığı ve enzim aktivasyonunun ekzojen substrat kazein ilavesiyle arttığı saptandı.

Ayrıca onkoproteinlerden özellikle myc ve myb onkoproteinlerinin kazein kinaz II'nin substratları olduğu gösterildi.

Çalışmamızda enzimin fosforilasyon aktivitesi ATP varlığında, GTP'den daha yüksek bulundu. En iyi aktivasyon tüm poliaminler için deney ortamı başına 10 μg poliamin, inhibisyon için ise 10 μg inhibitör kullanıldığında gözlemlendi.

Enzim aktivitesi üzerinde pH'in etkisi izlendiğinde, en yüksek aktivasyon, fosfat vericisi olarak GTP kullanıldığında ve Tris-HCl tamponu içerisinde pH 9.0'da gözlemlendi.

SUMMARY

In our study we evaluated the kinetic properties of rat lung casein kinase II under different conditions by using various assay systems. Protein kinases phosphorylate serine or threonine residues of many proteins, casein kinase II also phosphorylated these residues by using ATP or GTP as phosphate donors and Mg^{2+} or Mn^{2+} as metal cofactor. Rat lung casein kinase II was stimulated by polyamines and polybasic peptides and inhibited by dextran sulfate, heparin. The enzyme was not inhibited by the Na^+ ion.

Enzyme activity increased upon addition of casein as being exogenous substrate. The oncoproteins myc and myb were also found to be excellent substrates of casein kinase II.

In our study the phosphorylation activity of the enzyme was greater with ATP than with GTP. The largest activation was observed at 10 μg /assay of polyamines and the greatest inhibition was at 10 μg /assay of inhibitors.

The influence of pH on the enzyme activity was variable. The highest activity was obtained at pH 9.0 in Tris-HCl buffer system using GTP- Mg^{++} .

KAYNAKLAR

1. Rando and R.R., Regulation of protein kinases activity by lipids., *Faseb J.*, 2, 2348-2355, 1988.
2. Gierdano, S. et al., Proteins phosphorylated on tyrosine as markers of human tumor cell lines., *Int J Cancer.*, 39, 482-487, 1987.
3. Ruzzene and F.V., Purification and characterization of two casein kinases from ejaculated bovine spermatozoa., *J. Biochem.*, 112, 768-774, 1992.
4. Pinna L.A., *Biochem. Biophys. Acta.*, 1054, 267-284, 1990.
5. Tuazon PT and Trough., *Adv. Sec. Messenger phosphoprotein Res.*, 23, 123-164, 1991.
6. Barcia, Castro and Jullien., prothymosin α is phosphorylated by casein kinase II., *Febs.*, 312, 152-156, 1992.
7. P. Chaudhry., Purification and characterization of polyamine stimulated protein kinase (Casein kinase II) from bovine spermatozoa., *Arch. of Biochem. and Biophys.*, 288, 337-342, 1991.
8. O. Filhol and P. Loue., Casein kinase II and polyamines may interact in the response of adrenocortical cells to their trophic hormone. *Biochem. and biophys. Reser. Com.*, 180, 623-630, 1991.

9. O. Marin, F. Maggion., The conserved sequences for cdc 2 kinases and for casein kinase 2 are mutually incompatible., *Febs.*, 301, 111-114, 1992.
10. Palen, J.T., Phosphorylation of casein kinase II., *Biochemistry.*, 30, 5586-5590, 1991.
11. B. Boldyreff and C. Klett., Assignment of casein kinase II alpha sequences to two different human chromosomes., *Human Genetics.*, 89, 79-82, 1992.
12. J.A. Traugh, WJ Lin F.T. Dixelrod and P.T. Tuazon., The importance of subunit interaction in regulation of casein kinase II, *Biol. Med. Signal Trans.*, 224-229, 1990.
13. A. Robitzki and L. Bodenbach., Human casein kinase II., *The journal of biological chemistry.*, 268, 5694-5702, 1993.
14. Heldin, C.H. Westermark., Growth factors, mechanism of action and relation to oncogenes., *Cell.*, 37, 9-20, 1984.
15. T. Mittag and N. Yashimura., Polylysine stimulated protein phosphorylation in rabbit ciliary processes: Casein kinases activities., *Exp. Eye. Res.*, 56, 143-150, 1993.
16. J. Robert Manak., Phosphorylation of serum response factor by casein kinase II., *Oncogene.*, 703-711, 1993.
17. B. Davletov and J.M. Sontag., Phosphorylation of synaptotagmin I

- by CK2., *The Journal of biolo. chemis.*, 6816-6822, 1993.
18. D. Sacks and W. Dawis., Phosphorylation by CK2 alters the biological activity of calmodulin., *Biochem. J.*, 283, 21-24, 1992.
 19. C. Coleman and H.M. Wallace., Polyamine excretion from human cancer cells., *Bioch society Trans.*, 18 June 1990.
 20. Moulinoux., Biological significance of circulating polyamines in oncology., *Cellular and mol. biolo.* 37 (8), 773-783, 1991.
 21. Singh T.J., A new heparin inhibited and polyamine activated protein kinase from bovine kidney., *FEBS Lett.*, 243 (2), 289, 1989.
 22. R. Tipnis., Phosphorylation of ODC by CK2 from Raw 264 cells., *Cellular and mol. Biolog.*, 275-289, 1990.
 23. Druker BJ, Mamon HJ, Robert TM., Oncogenes growth factors and signal transduction., *N. Eng. Jour. Med.*, 321, 1383-91, 1989.
 24. Sheer, CJ, et al., The c-fms protooncogene product is related to the receptor for the mononuclear phagocyte growth factor CSF-1., *Cell.*, 41, 665-676, 1985.
 25. Down Ward, J et al., Close similarity of epidermal growth factor receptor and V-Erb B oncogen protein sequences., *Nature (London).*, 307, 521-527, 1984.

26. A.B. Stoler., Genes and cancer., The British Council 47, Nov 1, pp 64-75, 1991.
27. Little, CD., Amplification and expression of the c-myc oncogene in human lung cancer cell lines., Nature., 306, 194-196, 1983.
28. Kris R., Antibodies against a synthetic peptide as a probe for the kinase activity of the avian EGF reseptör and erb B protein., Cell., 40, 619-625, 1985.
29. E. Rydell, K.E. Magnusson, A Sje K. Axelson., CKII and protein kinase C activity during the differentiation of human colon carcinoma., Bio. Rep., 10, 3, 1990.
30. D. Hollywood., Signal Transduction., British Medical Bulletin., 47, 99-115, 1991.
31. C.W. Tabor and H. Tabor., Polyamines., Ann. Review, Bioch., 53, 749-790, 1984.