

## Pirüvat Kinazın Normal ve Tümör Meme Dokusundan Saflaştırılması ve Karakterizasyonu\*

Seval YILMAZ, Sema TEMİZER OZAN  
Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Elazığ - TÜRKİYE  
İbrahim Hanifi ÖZERCAN  
Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Elazığ - TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 19.08.2002

**Özet:** İnsan normal ve tümör meme doku pirüvat kinazı saflaştırılarak moleküler ağırlığı ve kinetik özellikleri araştırılmış, normal meme dokusu ile tümör meme dokusu pirüvat kinaz aktivite düzeyleri karşılaştırılmıştır.

DEAE Sefadeks A-50 kromatografi ile meme dokusunda pirüvat kinazın iki farklı formunun varlığı gösterilmiştir. SDS-PAGE ile alt birimlerinin moleküler ağırlığı normal dokuda I. pikte 30.000 Da, II. pikte 63.000 Da, tümör dokusunda ise I. pikte 16.500 Da, II. pikte 60.000 Da olarak saptanmıştır. Pirüvat kinaz aktivitesi tümör meme dokusunda normal meme dokusuna göre 5,2 kat fazla bulunmuştur. Pirüvat kinaz enzimi normal meme dokusunda I. pik 1591 kat, II. pik 636,4 kat, tümör dokusunda I. pik 219 kat, II. pik ise 318 kat saflaştırılabilmektedir.

Reaksiyon hız eğrisi normal ve tümör meme dokusu pirüvat kinazının I. pikinde hiperbolikti ve FDP tarafından aktive edilmemiştir. II. pikte reaksiyon hız eğrisi tümör meme dokusunda hiperbolik, normal meme dokusunda ise sigmoidaldır ve FDP tarafından aktive edilmiştir. Hill katsayısı PEP için enzimde en az iki bağlanma bölgesinin varlığını göstermiştir.

İnsan meme dokusundan izole edilen pirüvat kinaz izoenzimleri diğer doku pirüvat kinaz izoenzimleri ile karşılaştırıldığında bunların  $M_1$  ve  $M_2$  izoenzim olduğu ve normal meme dokusundaki  $M_2$  izoenzimin tümör meme dokusunda K izoenzime dönüşebileceği düşünülebilir.

**Anahtar Sözcükler:** İnsan meme tümörü, pirüvat kinaz, saflaştırma, kinetik özellikler

### Purification and Characterization of Pyruvate Kinase from Normal and Tumor Breast Tissues

**Abstract:** The molecular weight and kinetic properties of pyruvate kinase purified from human normal and tumor breast tissues were studied and the activity levels of pyruvate kinase from normal and tumor breast tissues were compared.

The presence of 2 forms of pyruvate kinase in human breast tissue was demonstrated by DEAE Sephadex A-50 chromatography. The molecular weight of subunits estimated by SDS-PAGE in forms I. and II. in normal breast tissue and in forms I. and II. in tumor breast tissue were 30,000 and 63,000 Da and 16,500 and 60,000 Da, respectively. It was found that the pyruvate kinase activity in tumor tissue was 5.2 times higher than that in normal tissue. Peaks I and II of pyruvate kinase were able to be purified about 1591-fold and 636.4-fold in normal breast tissue, and 219-fold and 318-fold in tumor breast tissue, respectively.

The reaction rate curve was hyperbolic in the first peaks of both normal and tumor breast tissue pyruvate kinase and was not activated by fructose-1, 6-diphosphate (FDP). Reaction rate curves in the second peaks of tumor breast tissue and normal breast tissue pyruvate kinase were hyperbolic and sigmoidal, respectively, and were activated by FDP. The Hill coefficient showed that there were at least 2 binding regions in the enzyme for PEP.

When compared with other tissue pyruvate kinase isozymes, it seems likely that the isoenzymes of pyruvate kinase isolated from human breast tissue were  $M_1$  and  $M_2$  isozymes and that the  $M_2$  isozyme of pyruvate kinase from normal breast tissue changed into K isoenzyme in tumor breast tissue.

**Key Words:** Human breast tumour, pyruvate kinase, purification, kinetic properties

\* Bu çalışma TÜBİTAK (VHAG-1442) ve FÜNAP (327) tarafından desteklenmiştir.

## Giriş

Genel anlamda kanser; hücresel kontrolün kaybolmasına bağlı olarak değişime uğramış bir hücreden bir çok hücrenin meydana gelmesi olayıdır. Çok hızlı olarak bölünen transformasyona uğramış hücreler, kendilerini çevreleyen dokudan farklı olarak morfolojik ve biyokimyasal özellikler göstermektedir (1).

Pirüvat kinaz (E.C.2.7.1.40), adenozin difosfatın substrat düzeyinde fosforilasyonunu katalize eden glikoliz yolunda bulunan allosterik bir enzimdir (2,3).

Çeşitli dokulardaki dağılımlarına göre insan pirüvat kinazı 4 farklı izoenzime ( $M_1$ ,  $M_2$ , L ve R) sahiptir (4). R tip pirüvat kinaz olgun eritrositlerde, L tip pirüvat kinaz karaciğer ve böbrek gibi glukoneojenik dokularda bulunmaktadır. R ve L tip pirüvat kinaz fruktoz-1,6-difosfat (FDP) tarafından aktive edilmektedir (5).  $M_1$  tip pirüvat kinaz yetişkin iskelet kasında bulunan tek izoenzim olup kalp kası ve beyinin ana izoenzimidir (3,6).  $M_1$  tip pirüvat kinazın kinetik ve regülatör özellikleri diğer 3 formdan farklı olarak Michaelis-Menten kinetiği göstermekte ve FDP tarafından aktive olmamaktadır (7-9).  $M_2$  tip pirüvat kinaz fötüs ve tümör dokularının major izoenzimi olup en fazla erişkin dokularda bulunur (5,10).  $M_2$  tip pirüvat kinaz fosfoenolpirüvat (PEP)'a ilgisi ile sigmoidal kinetik özellik göstermekte ve FDP tarafından da aktive edilmektedir.  $M_2$  izoenzimi elektroforetik ve immunolojik olarak  $M_1$  izoenzimine, kinetik olarak ta L izoenzime benzemektedir (3,6,11).

Tümör hücrelerinin enzimoloji ile ilgisi karbonhidrat, pürin ve pirimidin metabolizmasını düzenleyen enzim aktivitelerinde bir dengesizliği göstermesinden ileri gelmektedir (9,12,13). Benign ve malign doku proliferasyonlarında pirüvat kinaz aktivitesinin genellikle arttığı rapor edilmiştir. Bu da tümör hücrelerinin metabolizmasındaki enerji ve metabolitlerin sağlanması için glikolizisin gerekliliğini açıklamaktadır (14). Kanserdeki enzim aktivitesinin normal dokulardakinden farklı olması, kısmen değişmiş bir gen ifadesi ile açıklanmıştır (12,13,15).

Beyin tümörleri, retinoblastomalar, rhabdomyosarcomalar, medullar tiroid kanserleri, karaciğer, meme kanserleri ve hepatomalar gibi neoplastik dokularda K tip pirüvat kinaza değişim olduğu tespit edilmiş ve K tip ile malignite arasında bir ilişki olduğu bildirilmiştir. K izoenzimi karbonhidrat metabolizmasının düzenlenmesinde önemli rol

oynamaktadır (9,12,13,16). Bazı araştırmacılara göre (15,17); K ve M tip aynı genden, L tip ise farklı genden sentezlenmektedir. M ve L izoenzim ile karşılaştırıldığında K tip pirüvat kinaz farklı kinetik özellik göstermektedir. K tip izoenzim PEP'e daha az affinite göstermektedir. Hipodermiste pirüvat kinaz aktivitesinin arttığı ve ana substrat olarak karbonhidrat kullanıldığı, malign dokularda M formdan değişik bir izoenzim olan K formun oluştuğu rapor edilmiştir (9,13,15).

Bu bulgular ışığında insan normal meme dokusunda ve meme tümöründe pirüvat kinaz enzimi saflaştırılarak moleküler ağırlığı ve kinetik özellikleri çalışılmış, normal ve tümör meme dokusundaki sonuçlar karşılaştırılmıştır.

## Materyal ve Metot

Çalışma materyali Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Genel Cerrahi Servisinden mastektomi ile alınmış olup, Patoloji Anabilim Dalında II evre infiltrating duktal karsinom tanısı konmuş tümöral ve normal alanları içeren doku örneklerinden oluşmaktadır.

Pirüvat kinaz aktivitesi 340 nm'de NADH'in azalan absorbans hızının ölçülmesi esasına dayanan Beutler (18) yöntemine göre spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Protein miktar tayininde Lowry (19) metodu kullanılmıştır.

**Dokunun Homojenizasyonu :** Normal ve tümör meme dokusundan alınan örnekler 1 mM EDTA, 2 mM 2-merkaptetanol, 50 mM KCl içeren 50 mM Tris HCl (pH 7,5) tamponda 1/5 dilüsyon ile Sorvall Omni Mixer homojenizatörde homojenize edilmiştir. Homojenat soğutmalı santrifüjde (Sorvall RC-5B) +4 °C'de 20.000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilmiştir.

**Amonyum Sülfat ( $(NH_4)_2SO_4$  ile Doyurma :** Katı  $(NH_4)_2SO_4$  % 30-70 doyumluğa erişinceye kadar süpernatanta yavaş yavaş karıştırarak ilave edilmiştir. 20.000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilerek pelet kısmı alınmıştır.

**Dializ :** Pelet homojenat tamponunda 7 ml çözülüp dializ torbasına konularak +4 °C'de aynı tampona karşı yaklaşık 8 saat süre ile dializ edilmiştir. Dializ esnasında 3 kez tampon değiştirilmiştir.

**DEAE Sefadeks A-50 Kromatografi :** DEAE Sefadeks A-50 ile doldurulan kolondan (2,5 x 8 cm) 1 mM EDTA, 2 mM 2-merkaptetanol içeren 50 mM Tris-

HCl (pH 8,1) tampon geçirilerek dengelenmiştir. 3,5 ml enzim DEAE Sefadex A-50 kolona uygulanmıştır. Daha sonra tamponun 260 ml'sinde 0-0,6 M KCl gradienti kolona uygulanmış ve akış hızı 70 ml/saat olarak ayarlanarak 2,5 ml'lik fraksiyonlar toplanmıştır. Pirüvat kinaz aktivitesi yüksek olan fraksiyonlar birleştirilmiştir.

**Sefaril S-200 Kolon Kromatografi :** Sefaril S-200 kolona doldurulmuş ve kolondan 1 mM EDTA, 2 mM 2-merkaptotanol, 50 mM KCl içeren 50 mM Tris HCl (pH 7,5) tamponu geçirilerek dengelenmiştir. Enzim aktivitesi yüksek fraksiyonlardan 2,5 ml kolona (2,5 x 8 cm) uygulanarak kolon 27 ml/saat akış hızı ve aynı tampon ile elüe edilmiş ve 2,5 ml'lik fraksiyonlar toplanmıştır.

**Blue Sefaroz CL-6B Affinite Kromatografi :** Pirüvat kinaz aktivitesi yüksek olan fraksiyonlar 50 mM Tris HCl (pH 7,5) tampon ile yıkanarak dengeye getirilen Sefaroz CL-6B kolona (0,8 x 5,5 cm) uygulanmış ve akış hızı 110 ml/saat olarak ayarlanmıştır. Kolondan önce 50 mM Tris HCl (pH 7,5) tamponu, daha sonra 80 mM NaCl içeren 40 mM Tris HCl (pH 7,5) tamponu geçirilmiştir. 280 nm'de absorbans düşmeye başlayınca 80 mM NaCl, 0,1 mM FDP içeren 40 mM Tris HCl (pH 7,5) tamponu ile enzim elüe edilmiştir. Enzim aktivitesi yüksek olan tüpler birleştirilmiştir.

**SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektroforezi) :** Alt birimlerin moleküler ağırlık tayini Laemmli (20) metoduna göre Discontinuous SDS-PAGE tekniği ile yapılmıştır. Bir mm kalınlığında jeller hazırlanmış ve stacking jelde % 3, ayırım jelde % 11 akrilamid kullanılmıştır. Güç kaynağı sabit akım modunda (20 mA/jel) kullanılmış ve soğutma çeşme suyu ile

gerçekleştirilmiştir. Alt birimlerin moleküler ağırlık tayini için sığır albumini (66.000 Da), yumurta albumini (45.000 Da), gliseraldehid-3-fosfat dehidrogenaz (36.000 Da), karbonik anhidraz (29.000 Da), tripsinojen (24.000 Da), tripsin inhibitör (20.000 Da),  $\alpha$ -laktalbumin (14.200 Da) standartları kullanılmıştır. Pirüvat kinazın alt birimlerinin moleküler ağırlığı moleküler ağırlık log  $10^{-3}$  Rf grafiginden hesaplanmıştır.

## Bulgular

Sefadex A-50 kolonda tuz gradienti ile normal ve tümör dokusunda pirüvat kinaz enziminin iki pik halinde elüe edildiği saptanmıştır. DEAE Sefadex A-50 kolondan pirüvat kinazın I. piki 0,05 M KCl'de, II. piki 0,3 M KCl'de elüe edilmiştir. Bu sonuç insan meme doku pirüvat kinazının iki izoenziminin olduğunu göstermektedir.

Tümör meme dokusunda pirüvat kinaz aktivitesi normal meme dokusuna göre 5,2 kat fazla bulunmuştur. Tümör meme dokusunda II. pikin pirüvat kinaz aktivitesinde önemli bir artış saptanmıştır.

Saflaştırma basamakları Tablo 1 ve 2'de verilmiştir. Normal meme dokusunda pirüvat kinazın I. piki % 79,2 verimle 1591 kat, II. piki % 76 verimle 636,4 kat saflaştırılmıştır. Tümör meme dokusunda pirüvat kinazın I. piki % 3 verimle 219 kat, II. piki % 12 verimle 318 kat saflaştırılmıştır. Tümör meme dokusunda % verim düşük bulunmuştur. DEAE-Sefadex, Sefaril S-200, Sefaroz CL-6B affinite kromatografi esnasında enzim aktivitesi yüksek tüplerin birkaçı birleştirilmiştir. Buna bağlı olarak da tümör meme dokusunda total enzim aktivitesi düşmüş ve % verim azalmıştır.

Tablo 1. İnsan normal meme doku pirüvat kinazının saflaştırılması.

	Total protein (mg)	Total aktivite (ünite)	Spesifik aktivite (U/mg protein)	Verim (%)	Saflaştırma (kat)
Homojenat	91	9,6	0,11	-	-
%30-70 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -Dializ	11,7	8,71	0,75	90,7	6,8
Sefadex A-50 (I. pik)	5,2	7,8	0,93	81,3	8,5
Sefaril S-200 (I. pik)	1,7	7,7	4,5	80,2	40,9
Sefaroz CL-6B (I. pik)	0,043	7,6	175	79,2	1591
Sefadex A-50 (II. pik)	6,2	8,4	1,36	87,5	12,4
Sefaril S-200 (II. pik)	2,2	7,7	3,6	80,2	32,7
Sefaroz CL-6B (II. pik)	0,1	7,3	70	76	636,4

Tablo 2. İnsan tümör meme dokusu pirüvat kinazının saflaştırılması.

	Total protein (mg)	Total aktivite (ünite)	Spesifik aktivite (U/mg protein)	Verim (%)	Saflaştırma (kat)
Homojenat	47,3	27,1	0,57	-	-
%30-70 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> -Dializ	18,6	18,6	1,14	68,6	2
Sefadeks A-50 (I. pik)	2,8	7	2,5	26	4,4
Sefaril S-200 (I. pik)	0,9	2,8	3,1	10,3	5,4
Sefaroz CL-6B (I. pik)	0,0064	0,8	125	3	219
Sefadeks A-50 (II. pik)	3	11,2	3,7	41,3	6,5
Sefaril S-200 (II. pik)	1,35	7,2	5,3	27	9,3
Sefaroz CL-6B (II. pik)	0,018	3,3	181	12	318

Pirüvat kinazın alt birimlerinin moleküler ağırlığı saflaştırılmış enzimin SDS-PAGE'e uygulanması ile saptanmıştır (Şekil 1). Moleküler ağırlık; normal meme dokusunda I. pikte 30.000 Da, II. pikte 63.000 Da, tümör meme dokusunda I. pikte 16.500 Da, II. pikte 60.000 Da olarak bulunmuştur (Şekil 2-5). Saflaştırılmış insan tümör meme doku pirüvat kinazının II. pikinin moleküler ağırlığı normal meme dokusu ile hemen hemen aynı iken I. pikin moleküler ağırlığı normal meme dokusundan düşük bulunmuştur.

FDP varlığında ve yokluğunda, değişen PEP konsantrasyonlarında pirüvat kinaz aktivite grafiği şekil 6-9'da verilmiştir. Reaksiyon hız eğrisi normal ve tümör meme dokusu pirüvat kinazının I. pikinde hiperboliktir ve FDP tarafından aktive edilmemiştir. II. pikte reaksiyon hız eğrisi tümör meme dokusunda hiperbolik, normal meme dokusunda ise sigmoidaldır ve normal meme dokusunun II. piki FDP tarafından aktive edilmiştir. PEP için Hill katsayısı (nH) değeri normal meme dokusunda I. pik için 1, II. pik için 1,5, tümör meme dokusunda I. ve II. pik için 1,6'dır. nH PEP için enzimde en az iki bağlanma bölgesinin varlığını göstermiştir. Tümör dokusunun II. pikinde enzimin substrata olan ilgisi azalmıştır.

Saflaştırılmış insan meme pirüvat kinazı için optimal pH normal meme doku pirüvat kinazının I. pikinde 7,5, II. pikinde 7,1, tümör meme dokusu pirüvat kinazının I. pikinde 7,3, II. pikinde 7,1 olarak saptanmıştır (Şekil 10,11).

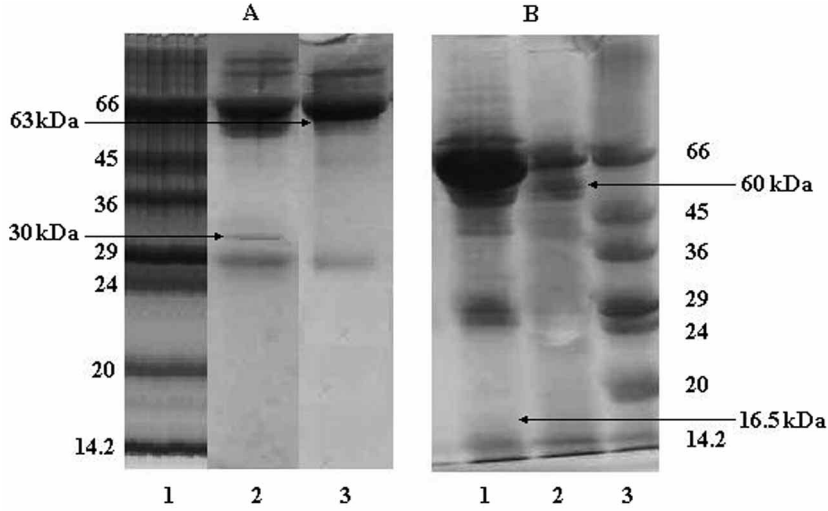
İnkübasyon ortamına MgCl<sub>2</sub> ilave edilmediği zaman enzim aktivitesi düşüktür. Ortama MgCl<sub>2</sub> ilavesi ile enzim aktivitesi artmıştır (Şekil 12,13).

## Tartışma

M<sub>1</sub> tip pirüvat kinaz izoenziminin subünitesinin moleküler ağırlığı sıgır ve tavşan iskelet kasında 57.000 Da, sıçan kalp kasında 57.000-59.000 Da, sıçan beyinde 56.000 Da, sıgır kalp kasında 55.000 Da, insan iskelet kasında 61.000 Da, insan akciğerinde 62.000 Da olarak rapor edilmiştir (18,21). Elde edilen SDS-PAGE verileri, insan meme doku pirüvat kinazının diğer doku pirüvat kinazlarında olduğu gibi tetramer olduğunu göstermektedir.

Hilf ve ark. (22)'ları normal meme veya fibroblastik hastalık olarak teşhis edilen örnekler ile karşılaştırıldığında duktal meme karsinomunda pirüvat kinaz aktivitesinin arttığını açıklamışlardır. Mastektomi esnasında lenfotik metastaz olmayan kanserlerde incelenen parametrelerin çoğunda farklılık olmamasına rağmen, pirüvat kinaz aktivitesinde belirgin bir artış saptanmıştır. Bu veri, duktal karsinomların yalnız hücre sayısındaki artışa bağlı olmayan farklı bir metabolik kapasiteye sahip olduğunu göstermektedir.

Tiroid kanseri ve hepatomalarda normal doku ile karşılaştırıldığında pirüvat kinazın spesifik aktivitesinin arttığı, sarkomalarda, insan beyin tümörlerinde pirüvat kinazın spesifik aktivitesinin düştüğü bildirilmiştir (23). Ibsen ve ark. (24)'ları pirüvat kinazın spesifik aktivitesi ile meme dokusunun malignitesi arasında bir ilişki olduğunu ileri sürmüşlerdir. Enzim aktivitesinin malign meme kanserinde yüksek iken normal meme dokusunda daha düşük olduğu bildirilmiştir. Benign meme tümörleri normal doku ile malign tümör arasında bir değer göstermiştir. Eğer tümörün nitelik tanımı yapılacak ise insan memesindeki neoplazma örneğinin heterojen yapısı



Şekil 1. A: SDS-PAGE ile normal meme dokusunda pirüvat kinazın subünitelerinin moleküler ağırlığının tayini.

1 : Standartlar

2 : Normal meme dokusunda pirüvat kinaz enzimi (I. pik)

3 : Normal meme dokusunda pirüvat kinaz enzimi (II. pik)

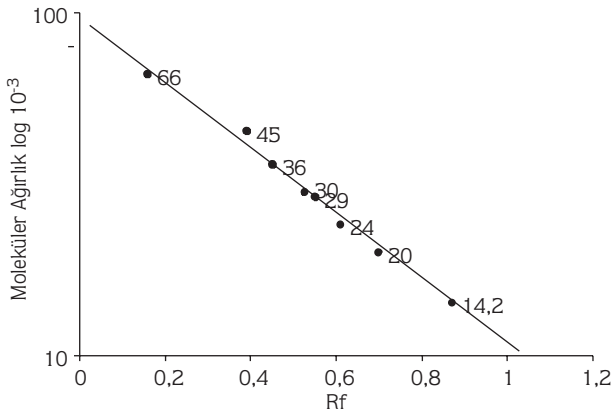
B: SDS-PAGE ile tümör meme dokusunda pirüvat kinazın subünitelerinin moleküler ağırlığının tayini.

1 : Tümör meme dokusunda pirüvat kinaz enzimi (I. pik)

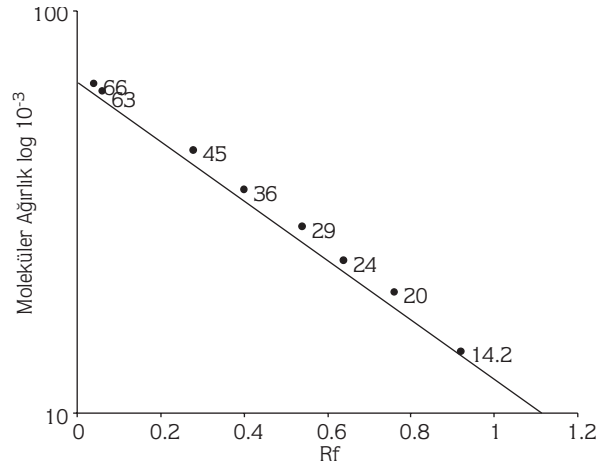
2 : Tümör meme dokusunda pirüvat kinaz enzimi (II. pik)

3 : Standartlar

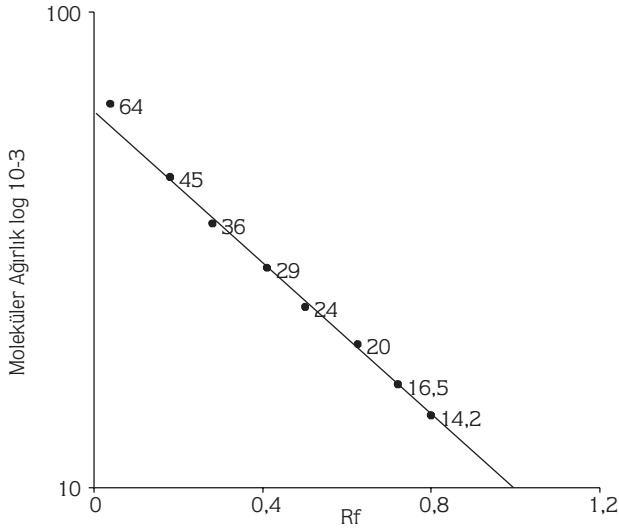
Standartlar:  $\alpha$ -laktalbumin (MW 14.2 kDa); tripsin inhibitör (MW 20 kDa); tripsinojen (MW 24 kDa); karbonik anhidraz (MW 29 kDa); gliseralehid-3-fosfat dehidrogenaz (MW 36 kDa); yumurta albumini (MW 45 kDa); siğır albumini (MW 66 kDa).



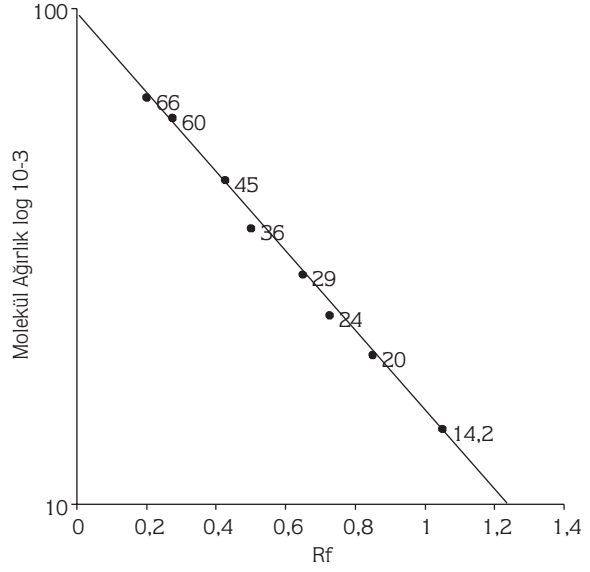
Şekil 2. SDS-PAGE ile normal meme dokusunda pirüvat kinazın (I. pik) subünitelerinin moleküler ağırlığının tayini. Rf (relatif mobilite): proteinin göç mesafesi (cm) / boyanın göç mesafesi (cm).  $\alpha$ -laktalbumin (MW 14.2 kDa); tripsin inhibitör (MW 20 kDa); tripsinojen (MW 24 kDa); karbonik anhidraz (MW 29 kDa); pirüvat kinaz (MW 30 kDa); gliseralehid-3-fosfat dehidrogenaz (MW 36 kDa); yumurta albumini (MW 45 kDa); siğır albumini (MW 66 kDa).



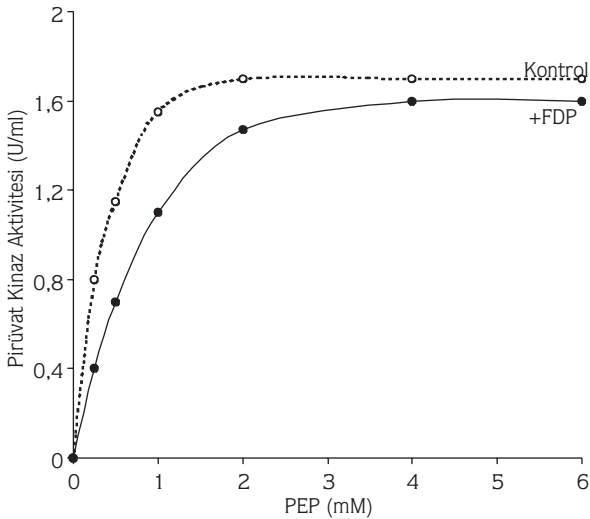
Şekil 3. SDS-PAGE ile normal meme dokusunda pirüvat kinazın (II. pik) subünitelerinin moleküler ağırlığının tayini. Rf (relatif mobilite): proteinin göç mesafesi (cm) / boyanın göç mesafesi (cm).  $\alpha$ -laktalbumin (MW 14.2 kDa); tripsin inhibitör (MW 20 kDa); tripsinojen (MW 24 kDa); karbonik anhidraz (MW 29 kDa); gliseralehid-3-fosfat dehidrogenaz (MW 36 kDa); yumurta albumini (MW 45 kDa); pirüvat kinaz (MW 63 kDa); siğır albumini (MW 66 kDa).



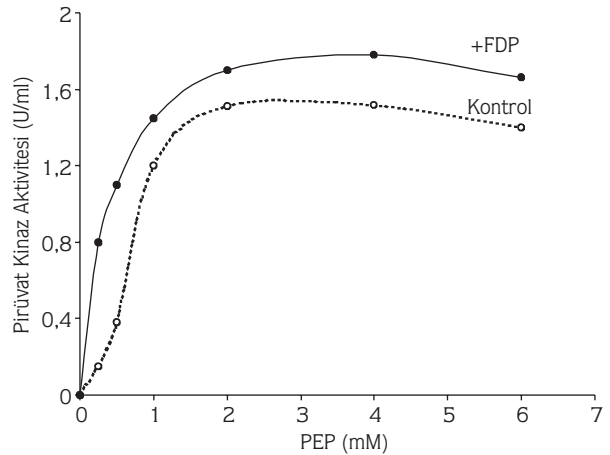
Şekil 4. SDS-PAGE ile tümör meme dokusunda pirüvat kinazın (I. pik) subünitelerinin moleküler ağırlığının tayini. Rf (relatif mobilite): proteinin göç mesafesi (cm) / boyanın göç mesafesi (cm).  $\alpha$ -laktalbumin (MW 14,2 kDa); pirüvat kinaz (MW 16,5 kDa); tripsin inhibitör (MW 20 kDa); tripsinojen (MW 24 kDa); karbonik anhidraz (MW 29 kDa); gliseraldehid-3-fosfat dehidrogenaz (MW 36 kDa); yumurta albumini (MW 45 kDa); sığır albumini (MW 66 kDa).



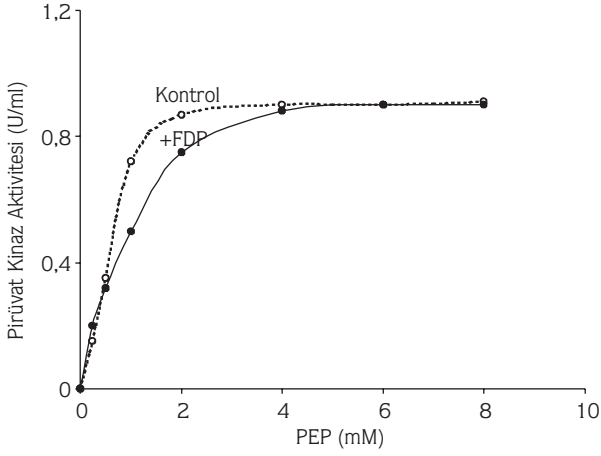
Şekil 5. SDS-PAGE ile tümör meme dokusunda pirüvat kinazın (II. pik) subünitelerinin moleküler ağırlığının tayini. Rf (relatif mobilite): proteinin göç mesafesi (cm) / boyanın göç mesafesi (cm).  $\alpha$ -laktalbumin (MW 14,2 kDa); tripsin inhibitör (MW 20 kDa); tripsinojen (MW 24 kDa); karbonik anhidraz (MW 29 kDa); gliseraldehid-3-fosfat dehidrogenaz (MW 36 kDa); yumurta albumini (MW 45 kDa); pirüvat kinaz (MW 60 kDa); sığır albumini (MW 66 kDa).



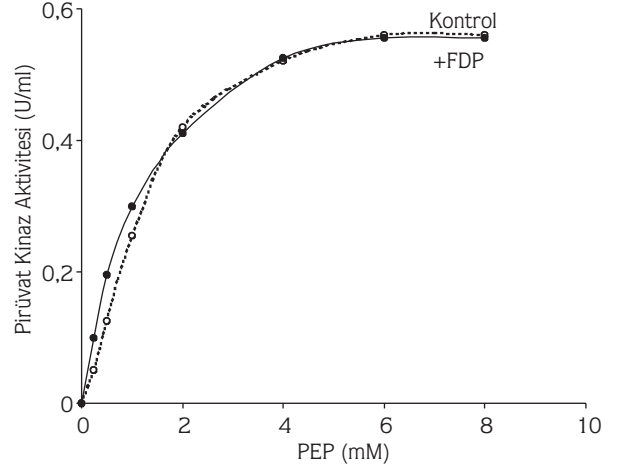
Şekil 6. Saflaştırılmış insan normal meme pirüvat kinaz aktivitesinin (I. pik) PEP konsantrasyonuna bağlı olarak değişimi (o) kontrol, (●) İnkübasyon ortamına 0,01 M FDP ilave edilmiş.



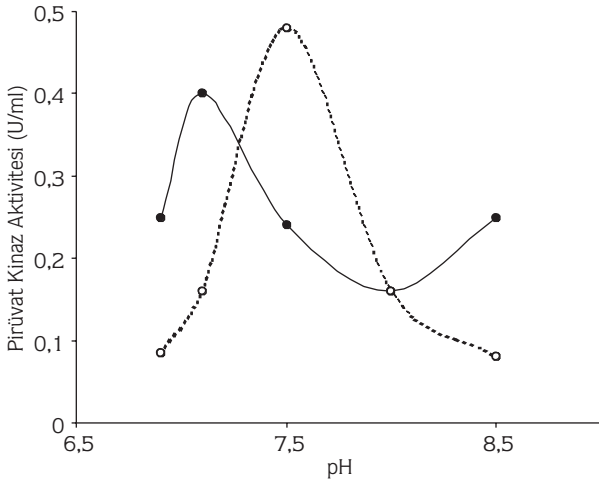
Şekil 7. Saflaştırılmış insan normal meme pirüvat kinaz aktivitesinin (II. pik) PEP konsantrasyonuna bağlı olarak değişimi (o) kontrol, (●) İnkübasyon ortamına 0,01 M FDP ilave edilmiş.



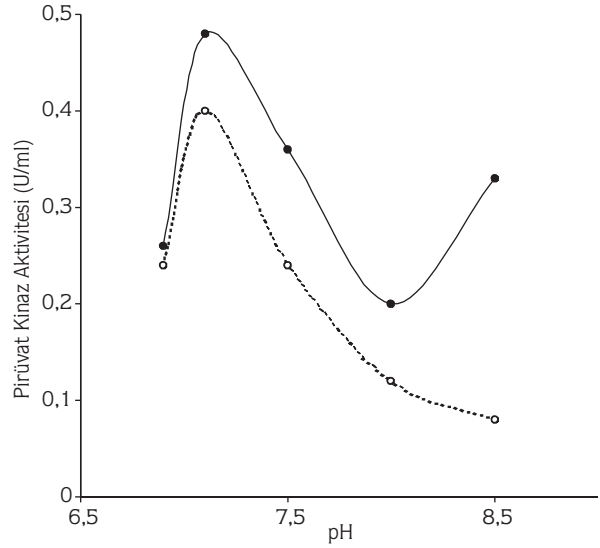
Şekil 8: Safleştirilmiş insan tümör meme dokusu pirüvat kinaz aktivitesinin (I. pik) PEP konsantrasyonuna bağlı olarak değişimi (o) kontrol, (●) İnkübasyon ortamına 0,01 M FDP ilave edilmiş.



Şekil 9: Safleştirilmiş insan tümör meme dokusu pirüvat kinaz aktivitesinin (II. pik) PEP konsantrasyonuna bağlı olarak değişimi (o) kontrol, (●) İnkübasyon ortamına 0,01 M FDP ilave edilmiş.



Şekil 10: Safleştirilmiş insan normal meme dokusu pirüvat kinazının optimal pH'sının belirlenmesi (o) I. pik, (●) II. pik. 37 oC inkübasyon ortamına enzim substratı olarak 3 mM PEP ilave edilmiştir.

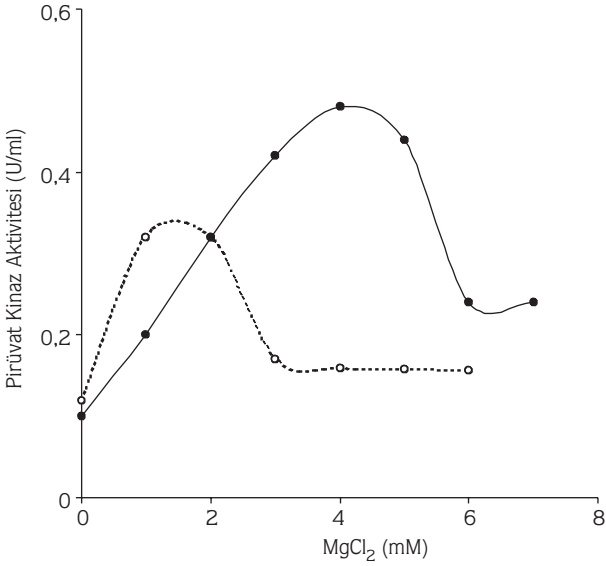


Şekil 11: Safleştirilmiş insan tümör meme dokusu pirüvat kinazının optimal pH'sının belirlenmesi (o) I. pik, (●) II. pik. 37 °C inkübasyon ortamına enzim substratı olarak 6 mM PEP ilave edilmiştir.

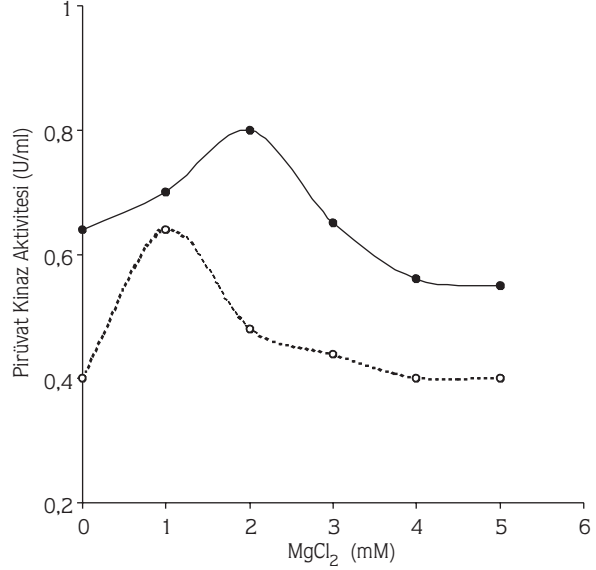
özel dikkat gerektirmektedir. Glikolitik enzimlerin aktivitesindeki değişiklikler neoplastik meme bezinin büyümesi için önemli olabilir (25).

Tek olarak veya hormonal ajanlar ile birlikte trastuzumab ile tedavi edilmiş meme kanserli hastaların

% 78'inde tümör M<sub>2</sub> pirüvat kinaz aktivitesi ile hastalığın klinik safhası arasında pozitif bir korelasyon olduğunu bildirilmiş ve meme tümörünün klinik safhasının belirlenmesinde tümör M<sub>2</sub> pirüvat kinaz enziminin araç olarak kullanılabileceğini desteklenmiştir (26,27).



Şekil 12. Saflaştırılmış insan normal meme dokusu pirüvat kinaz aktivitesi üzerine MgCl<sub>2</sub>'ün etkisi. (o) I. pik, (●) II. pik. 37 °C inkübasyon ortamına enzim substratı olarak 3 mM PEP, I. pike 7,5, II. pike 7,1 pH'da Tris HCl tamponu ilave edilmiştir.



Şekil 13. Saflaştırılmış insan tümör meme dokusu pirüvat kinaz aktivitesi üzerine MgCl<sub>2</sub>'ün etkisi. (o) I. pik, (●) II. pik. 37 °C inkübasyon ortamına enzim substratı olarak 6 mM PEP, I. pike 7,3, II. pike 7,1 pH'da Tris HCl tamponu ilave edilmiştir.

Çalışmada normal meme doku pirüvat kinazının spesifik aktivitesi 0,11 U/mg protein, tümör doku pirüvat kinazının ise 0,57 U/mg protein olarak bulunmuştur. Sonuçlar, tümör dokusunda pirüvat kinazın spesifik aktivitesinde genellikle gözlenen artma ile uyum içindedir.

Malign dokularda izoenzim dönüşümünün, M izoenzimden K izoenzime olduğu rapor edilmiştir (9,16). Pirüvat kinazın spesifik aktivitesi ile meme tümörü arasında bir ilişki olduğu, tümör gelişimi esnasında pirüvat kinazın II. fraksiyonunda spesifik aktivitenin arttığı bulunmuştur. Çeşitli tümörlerde bulunan ve M<sub>2</sub> pirüvat kinaz ile aynı olan tümör meme dokusundaki II. fraksiyonun L-sistein inhibisyonuna duyarlı olduğu, normal meme dokusundaki II. fraksiyonun ise duyarlı olmadığı gözlenmiştir. Normal ve tümör dokusunda ATP, L-sistein, L-fenilalanin inhibisyonunun ve moleküler ağırlığının değişmesi izoenzim dönüşümünün olabileceğini ve tümör dokusundaki II. fraksiyonun glikolitik hızın artmasına katkıda bulunabileceğini göstermektedir (16).

Farina ve ark. (28) hepatomada, M izoenzim K izoenzime dönüşümünün histolojik farklılık ile ilgili olduğunu açıklamışlardır. Tolle ve ark. (29)'ları ratların nöron ve gliyal hücrelerden, nöroblastoma ve glioblastomaların kültürlerinden izole edilmiş çalışmada M izoenzim K izoenzime dönüştüğünü ve genelde

tümörlerin büyüme hızının arttıkça hücrelerde bulunan M izoenzim K izoenzime dönüşme hızının da arttığını bildirmişlerdir.

Tümör hücrelerindeki M<sub>2</sub> tip pirüvat kinazın, böbrek medullası ve akciğer dokusunun glikolitik hücrelerinden izole edilen enzimden farklı olduğu görülmüştür. Tümör hücresindeki M<sub>2</sub> tip pirüvat kinazın spesifik formu c-AMP'ye bağlı olmayan protein kinaz tarafından fosforile edilerek inhibe edilmektedir. Bu dönüşümün nükleik asit biyosentezi için habercilerin sağlanmasını artırdığı ve glukozdan riboz karbohidrat akışını onayladığı şeklinde yorumlanmıştır (30).

Pirüvat kinaz enziminin maksimal aktivite gösterebilmesi için Mg<sup>++</sup> ve K<sup>+</sup> gibi bazı metal iyonlarına veya NH<sub>4</sub><sup>+</sup> iyonuna kofaktör olarak ihtiyacı vardır. Enzim ile substrat arasındaki etkileşim, enzime bağlanan bu katyonlar vasıtası ile olmaktadır (31,32).

M<sub>1</sub> tip pirüvat kinaz için optimal pH'nın 7,5, PEP eğrisinin hiperbolik; M<sub>2</sub> tip için optimal pH'nın 6,9, PEP eğrisinin sigmoidal olduğu bildirilmiştir. Pirüvat kinaz için optimal pH sığır iskelet kasında 7,1, insan iskelet kasında 7,5, domuz kalp kasında 7,2, sığır beyinde 6,8-7,2 arasında bulunmuştur. Tavuk karaciğer, domuz böbrek, insan akciğer, köpek akciğer ve tümörü, rat karaciğer ve hepatomasında pirüvat kinaz enzimi düşük PEP



konsantrasyonunda FDP tarafından aktive edilmektedir (6,11,18).

İnsan, domuz ve sığır L tip pirüvat kinaz enzimini düşük PEP konsantrasyonunda FDP, önemli derecede aktive etmektedir. Bu aktivasyon tavuk karaciğer, insan akciğer, domuz böbrek, domuz akciğer ve tümörü, rat hepatoma ve rat karaciğerindeki  $M_2$  izoenzimi ile de meydana gelmektedir. İskelet kasındaki pirüvat kinazın FDP tarafından etkilenmediği görülmüştür (6).

## Kaynaklar

1. Onat, T., Emerk, K.: Temel Biyokimya. Saray Medikal Yayıncılık, İzmir. 1997; 661-662.
2. Muirhead, H.: Isoenzymes of pyruvate kinase. Biochem. Soc. Trans., 1990; 18: 193-196.
3. Cuenllas, E., Gaitan, S., Bueren, J.A., Tejero, C.: Kinetic studies of pyruvate kinase during in vitro differentiation of GM-CFC haemopoietic precursor and bone marrow cells in mice. Biosci. Rep., 1990; 10: 141-154.
4. Eigenbrodt, E., Reinacher, M., Scheefers-Borchel, U., Scheefers, H., Friis, R.: Double role for pyruvate kinase type  $M_2$  in the expansion of phosphometabolite pool found in tumor cells. Crit. Rev. Oncog., 1992; 3: 91-115.
5. Heinrichs, M., Jacobasch, G., Scheiner-Bobis, K., Bertram, S., Eigenbrodt, E., Reinacher, M.: Human erythrocyte pyruvate kinase (L/R-PK): Production and characterization of a monoclonal antibody. Biomed. Biochim. Acta., 1987; 46: 223-228.
6. Kiffmeyer, W.R., Farrar, W.W.: Purification and properties of pig heart pyruvate kinase. J. Protein Chem., 1991; 10: 585-591.
7. Ibsen, K.H.: Interrelationships and functions of the pyruvate kinase isozymes and their variant forms: A Review. Cancer Res., 1977; 37: 341-353.
8. Kaloyianni-Dimitriades, M.G., Beis, I.D.: Purification, catalytic and regulatory properties of *Rana ridibunda* erythrocyte pyruvate kinase. Comp. Biochem. Physiol., 1984; 7B: 245-250.
9. Elbers, J.R., Unnik, J.A., Rijksen, G., Oirschot, B.A., Roholl, P.J., Osting, J., Staal, G.E.: Pyruvate kinase activity and isozyme composition in normal fibrous tissue and fibroblastic proliferations. Cancer, 1991; 67: 2552-2559.
10. Mazurek, S., Grimm, H., Oehmke, M., Weisse, G., Teigelkamp, S., Eigenbrodt, E.: Tumor  $M_2$ -PK and glutaminolytic enzymes in the metabolic shift of tumor cells. Anticancer Res., 2000; 20: 5151-5154.
11. Terlecki, G.: Purification and properties of pyruvate kinase type  $M_1$  from bovine brain. Int. J. Biochem., 1989; 21: 1053-1060.
12. Weernink, P.A.O., Rijksen, G., Staal, G.E.J.: Phosphorylation of pyruvate kinase and glycolytic metabolism in three human glioma cell lines. Tumour Biol., 1991; 12: 339-352.
13. Helmy, E., Unnik, A.M., Rijksen, G., Smits, G., Staal, J.: Cellular expression of K-type pyruvate kinase in normal and neoplastic human tissues. Cancer, 1991; 68: 2595-2601.
14. Arai, T., Ogino, T., Gunji, M., Washizu, T., Komori, S., Washizu, M.: Changes in glucose transport activities in mammary adenocarcinoma of dogs. Res. Vet. Sci., 1997; 62: 85-86.
15. Kwiatkowska, D., Dawiskiba, J., Kwiatkowska, J.: Alterations in erythrocyte enzymes in cancer. Neoplasma, 1980; 27: 415-422.
16. Yılmaz, S., Ozan, S., Özercan, I.H.: Comparison of pyruvate kinase variants from breast tumor and normal breast. Arch. Med. Res., 2003; 34: 315-324.
17. Cardenas, J.M., Dyson, R.D., Strandholm, J.J.: Bovine pyruvate kinases. I. purification and characterization of the skeletal muscle isozyme. J. Biol. Chem., 1973; 248: 6931-6937.
18. Beutler, E., Blume, K.G., Kaplan, J.C., Löhr, G.W., Ramot, B., Valentine, W.N.: International committee for standardization in haematology: Recommended methods for red-cell enzyme analysis. Br. J. Haematol., 1977; 35: 311-340.
19. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 1951; 193: 265-275.
20. Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 1970; 227: 680-685.
21. Imamura, K., Tanaka, T.: Pyruvate kinase isozymes from rat. In: Wood, M. A. Eds. In Methods in Enzymology. Academic Press, New York, 1982; 150-165.
22. Hilf, R., Wittliff, J.L., Rector, W.D., Savlov, E.D., Hall, T.C., Orlando, R.A.: Studies on certain cytoplasmic enzymes and specific estrogen receptors in human breast cancer and in non-malignant diseases of the breast. Cancer Res., 1973; 33: 2054-2062.
23. Pedersen, N.: The glycolytic enzyme activity of the human cervix uteri. Cancer, 1975; 35: 469-474.
24. Ibsen, K.H., Orlando, R.A., Garratt, K.N., Hernandez, A.M., Giorlando, S., Nungaray, G.: Expression of multimolecular forms of pyruvate kinase in normal benign and malignant human breast tissue. Cancer Res., 1982; 42: 888-892.

25. Larner, E.H.: Rutherford, C L.: Application of a microchemical technique to the elucidation of enzyme activity profiles within single human mammary tumors. *Cancer*, 1978; 41: 1863-1870.
26. Hoopmann, M., Warm, M., Mallmann, P., Thomas, A., Gohring, U.J., Schondorf, T.: Tumor M<sub>2</sub> pyruvate kinase-determination in breast cancer patients receiving trastuzumab therapy. *Cancer Lett.*, 2002; 187: 223-228.
27. Luftner, D., Mesterharm, J., Akrivakis, C., Geppert, R., Petrides, P.E., Wernecke, K.D., Possinger, K.: Tumor type M<sub>2</sub> pyruvate kinase expression in advanced breast cancer. *Anticancer Res.*, 2000; 20: 5077-5082.
28. Farina, F.A., Shatton, J.D., Morris, H.P., Weinhouse, S.: Isozymes of pyruvate kinase in liver and hepatomas of the rat. *Cancer Res.*, 1974; 34: 1439-1446.
29. Tolle, S.W., Dyson, R.D., Neburgh, R.W., Cardenas, J.M.: Pyruvate kinase isozymes in neurons, glia, neuroblastoma and glioblastoma. *J. Neurochem.*, 1976; 27: 1355-1360.
30. Noda, S., Horn, F., Linder, D., Schoner, W.: Purified pyruvate kinases type M<sub>2</sub> from unfertilized hen's egg substrates of protein kinase C. *Eur. J. Biochem.*, 1986; 155: 643-651.
31. Yılmaz, S.: İnsan eritrosit ve karaciğer pirüvat kinazının kinetik özellikleri, Doktora Tezi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Elazığ. 1997.
32. Leon, O., Moran, A., Gonzalez, R.: Purification and characterization of pyruvate kinase from muscle of the sea mollusc, *Concholepas concholepas*. *Com. Biochem. Physiol.*, 1982; 72B: 65-69.