

TURNA BALIĞI BEYAZ KASLARINDAN PARVALBUMİNLERİN  
SEPARASYONU VE SAFLAŞTIRILMASI<sup>1</sup>

Arif Altıntaş<sup>2</sup>

Separation et la purification des Parvalbumines du muscle blanc du Brochet (*Esox lucius*)

**Résumé:** *Ce travail a été effectué à l'Université de Liège en Belgique. Le travail a été établi sur du muscle nettoyé de 40 g dans les formes requises et qui a été obtenu du laboratoire de la Biochimie Musculaire et la purification a été appliquée d'après la méthode décrite par Gosselin-Rey et Gerday (1977).*

*On a utilisé du spectre d'absorbtion en UV (320-240 nm) pour vérifier les PA dans les fractions chromatographiques.*

*A la fin de ce travail, on a obtenu deux isotopes PA du muscle blanc du Brochet (PA II et PA III). Les isotopes ont été vérifiées par l'électrophorese en gel de polyacrylamide en présence d'Urée 2M. et au point de vue de purification, le rendement de ce travail a été calculé comme 475 mg/kg dans le muscle gras pour PA III et 175 mg/kg dans le muscle frais pour PA II.*

*D'autre part, on a démontré que les PA du Brochet étaient riches en phénylalanine, pauvres en tyrosine pas de tryptophane et que la PA II migrait plus rapide que la PA III au cours de l'électrophorese en gel de Polyacrylamide.*

**Özet:** *Bu çalışma Belçika Liege Üniversitesinde gerçekleştirilmiştir. Çalışma, Kas Biyokimyası Laboratuvarınca temin edilen ve usulüne uygun olarak temizlenmiş 40 g. taze turna balığı kası üzerinde yürütülmüş ve saflaştırma, Gosselin-Rey ve Gerday (1977)'ın bildirdikleri metoda göre yapılmıştır.*

<sup>1</sup> Bu çalışma, Belçika-Liege Üniversitesi Fen Fak. Kas Biyokimyası Lab. da yapılmıştır.

<sup>2</sup> Dr. Araş. Gör., A.Ü. Veteriner Fakültesi, Biyokimya Bilim Dalı, Ankara.

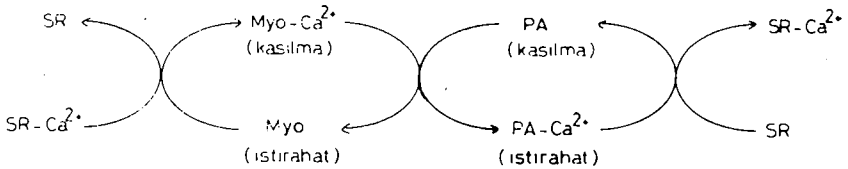
*Kromatografik fraksiyonlarda parvalbuminlerin yerini tesbit etmek için onların U.V. absorpsiyon spektrumundan (320–240 nm) yararlanılmıştır.*

*Sonuç olarak, turna balığı beyaz kaslarından iki PA izotipi (PA II ve PA III) elde edilmiş, izotiplerin saflığı 2M Üre varlığında Poliakrilamid jel elektroforezle doğrulanmış ve bu çalışmada verim, saf-laştırma işlemi açısından, 1 kg taze kasta PA III için 475 mg, PA II için 175 mg olarak hesaplanmıştır.*

*Diğer taraftan Turna balığı PA'lerinin fenilalaninden zengin, trozinden fakir oldukları ve hiç triptofan ihtiva etmedikleri ve poliakrilamid jel elektroforezde izotip II'nin izotip III'den daha hızlı göç ettiği gösterilmiştir.*

### Giriş

Parvalbuminler (PA), kas hücre sitoplazmasının (Sarkoplazma) suda eriyebilir proteinlerinden olup globuler form gösterirler ve molekül ağırlıkları 12000 dalton civarındadır. Isıya karşı dayanıklı proteinlerdendir. İzoelektrik noktaları (pI) 3,9 ile 6,6 arasında olup 259 nm de maksimum absorpsiyon gösterirler. Yüksek bir affiniteyle ( $K_{1,2} = 10^7 - 10^8 M^{-1}$ ) her molekülü tarafından iki kalsiyum iyonu ( $Ca^{+2}$ ) bağlayabilirler. Kaslarda, kasılma-gevşeme olayları sırasındaki foksiyonları şekil 1'de görüldüğü gibi şematize edilebilir (3).



Kaslarda PA konsantrasyonu, kasın kontraksiyon kapasitesi ile artar. Bu nedenle hızlı kasılan kaslarda PA düzeyleri yüksektir. Denemeler; dekalsifiye olmuş PA'lerin, miyofibrillerin ATP-az aktivitesini tamamen bloke ettiğini, sarkoplazmik retikulumun PA'leri kalsifiye etmeğe yetenekli olduğunu göstermiştir (2, 4, 10).

Kaslar total PA miktarı ve izotip yönünden farklılıklar gösterir. Suda yaşayan hayvanların hızlı kasılan kaslarında bol miktarda (300  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  yaş ağırlık) PA mevcuttur (6,7). Tersine, karada yaşayanlarda ise eseri (10-30  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  yaş ağırlık) miktardadır (8, 9). Sazanların beyaz kasında 3 izotip (II, III ve IV), Kurbağanın ve turna balığınıninkinde iki izotip (II ve III) izole edilmiştir. Daha önceleri kırmızı kaslardan bol miktarda izole edilen komponent I, bazı beyaz kaslarda da (extraocular kas, lateral protractor-hyoideus kası) gösterilmiştir (3).

Mide, barsak, karaciğer, böbrek, dalak, serum ve akciğerler üzerine sistematik incelemeler PA'lerin bu dokularda sadece iz miktarlarda bulunduğunu göstermiştir. Diğer taraftan PA'ler antijenik karakterlidirler ve polimorfizm gösterirler (3).

Bu çalışma, Turna balığı beyaz kaslarından PA izotiplerinin ayırılması ve bazı özelliklerinin incelenmesi ve bu arada kullanılan metoda göre saflaştırma işleminin veriminin hesaplanması amacıyla yapılmıştır.

### Materyal ve Metot

Bu çalışmada, Belçika Turna Balıklarının, usulüne uygun olarak temizlenmiş beyaz kasları materyal olarak kullanılmıştır.

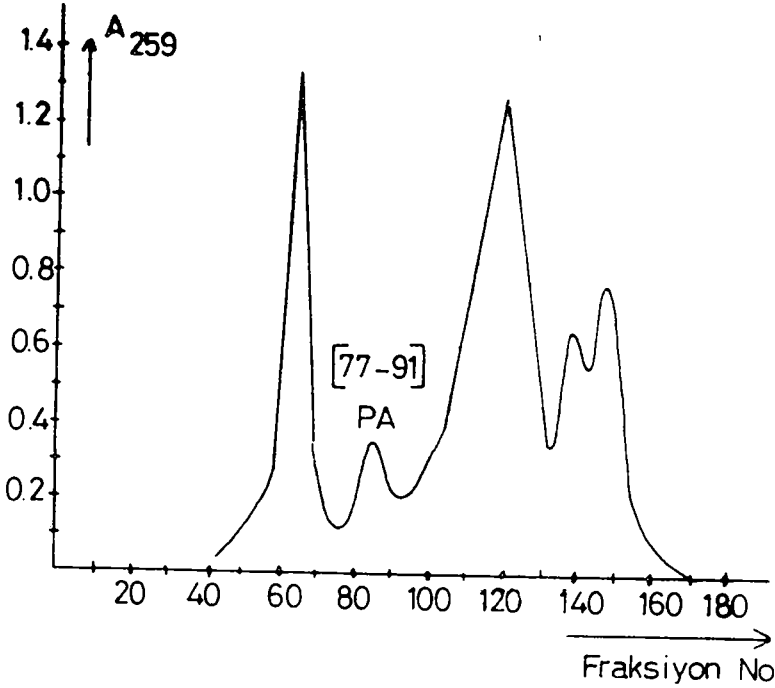
Parvalbuminlerin elde edilmesi Gosselin-Rey ve Gerday (6) tarafından bildirilen metoda göre yapılmıştır. Metot sırasında elde edilen kromatografik fraksiyonlarda PA'lerin varlığı spesifik UV spektrumlarıyla doğrulanmış ve metot, her aşamada alınan örneklerin 2M Üre varlığında % 7.5 Poliakrilamid gel üzerinde elektroforeze tabi tutulmasıyla kontrol edilmiştir. Parvalbuminlerin, ortamın tuzlarından arındırılmasında G-25 Sefadex kolon kromatografiden yararlanılmıştır. Bu şekilde  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 'lü ortama alınan PA izotipleri  $-40^\circ\text{C}$  de ki Metanolde dondurularak Liyofilizatöre yerleştirilmiş ve böylece izotipler liyofilize halde ayrı ayrı elde edilmişlerdir.

### Bulgular

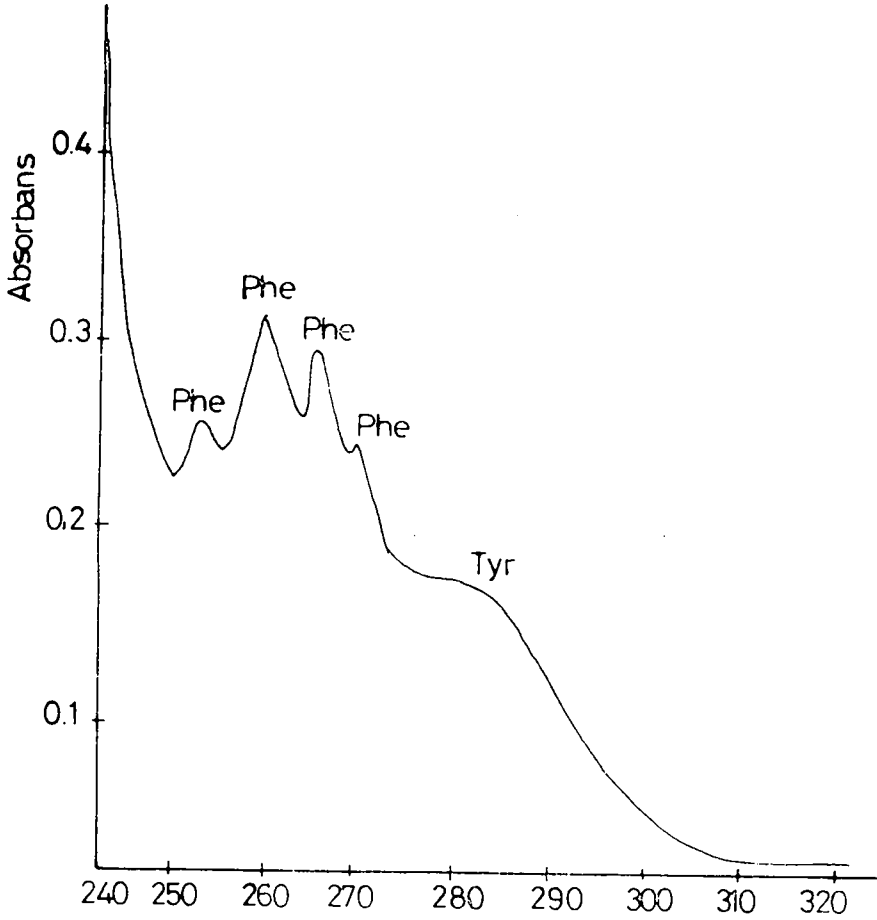
Bu çalışma sonunda, Turna Balığı (*Esox lucius*) kas ekstresinden iki PA izotipi liyofilize halde (PA III 19 mg ve PA II 7 mg) elde edilmiştir. Bu proteinlerin saflığı Üre-Poliakrilamid gel elektroforezle

doğrulanmış ve çalışmanın verimi, PA izotiplerinin saflaştırılması yönünden, PA III ve PA II için sırasıyla 475 mg / kg taze kas ve 175 mg / kg taze kas olarak hesaplanmıştır.

Metot içerisinde bir uygulama olan ACA54 Üzerinde kromatografi profili Şekil 2'de, PA'lerin genel karakterlerinden olan UV absorpsiyon spektrumu ve 320-240 nm dalga boyu arası tarama profili Şekil 3'de ve yine metot içinde bir uygulama olan DEAE-Sellüloz iyon değişimi kromatografisi profili ile izotiplerin separasyonu Şekil 4'de gösterilmiştir.

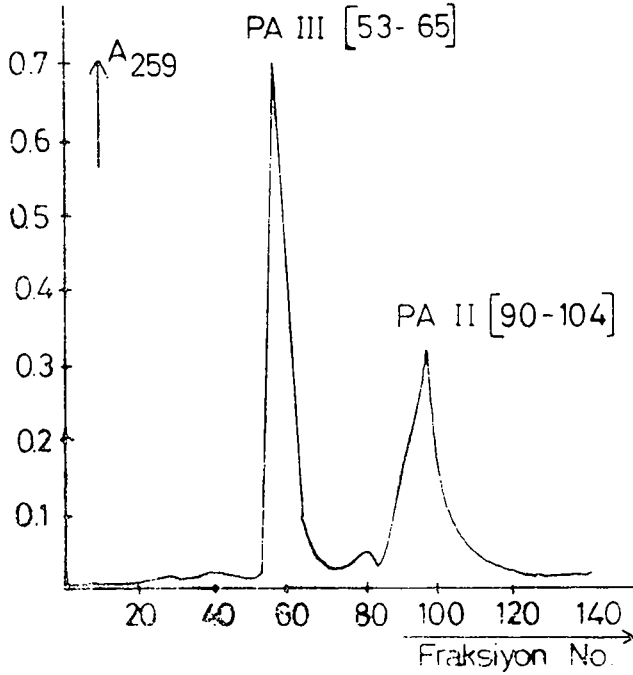


Şekil 2 incelendiğinde, PA'lerin ACA54 moleküler elek üzerinde kromatografisi sonucunda kolondan ikinci sırada elüe edildiği ve molekül ağırlığının diğer kas proteinlerinin çoğundan düşük olduğu görülmektedir. Parvalbumin izotiplerinin birbirinden ayırdedilmesinde iyon değişimi kromatografisinden (Örneğin DEAE-Sellüloz) yararlanılır. Zira molekül ağırlıkları birbirine oldukça yakındır. (Genellikle 12000 dalton civarındadır).



Şekil 4 incelendiğinde, PA III izotipinin, DEAE-Sellüloz kolondan, PA II'den daha önce elüe olduğu görülmektedir. Bu durum izotiplerin izoelektrik nokta pH'larının (pI) farklı oluşundan kaynaklanmaktadır. (PA III için  $pI = 5$  ve PA II için  $pI = 4.5$ ). Diğer taraftan Üre-Poliakrilamid gel elektroforez'de PA II'nin PA III'den daha hızlı göç ettiği tesbit edilmiştir. Bu ise elektroforetik mobilitelelerinin farklı olduğunu göstermektedir.

Şekil 3 incelendiğinde Turna Balığına ait PA'lerin fenilalaninden zengin (252-274 nm arasında 4 pik), tirozinden fakir (280-290 nm arası 1 pik) ve triptofandan noksan (290-300 nm arası) olduğu dikkati çekmektedir. Bu durum PA'lerin genel karakterlerindedir. Buradaki



tirozin piki PA II'nin varlığından ileri gelmektedir. Zira PA III tirozin kalıntısı ihtiva etmezken PA II tirozin ihtiva eder (20 fenilalanin için 1 tirozin kalıntısı).

Yapılan araştırmalar bu proteinlerin mide, barsak, karaciğer, böbrek, dalak, serum ve akciğerlerde iz miktarlarda da olsa mevcut olduğunu göstermiştir. Ancak, buralardaki varlıklarının nedeni ve fizyolojik önemi henüz iyice bilinmemektedir.

### Tartışma ve Sonuç

Özellikle suda yaşayan canlılar açısından, kaslarda Kasılma-Gevşeme olayları esnasında  $Ca^{+2}$  iyonlarının ve Parvalbuminlerin regülatör rolünün çok önemli olduğu kabul edilmektedir. Her ne kadar PA denince suda yaşayan canlıların  $Ca^{2+}$  bağlayıcı kas proteinlerinden biri anlaşılmakta ise de yüksek omurgalı kaslarında da önemli roller yüklenerek var olduğu söylenebilir.

Aktive olmuş miyofibrillerden ( $Myo-Ca^{2+}$ ) Sarkoplazmik Retikulumu (SR) kalsiyumun transportunda PA'ler bir mekik meka-

nizma "Shuttle Mechanism" olarak yorumlanmıştır. Kalsiyumla doymuş PA konsantrasyonu Sarkoplazmik retikulumun ATP-az'ına kalsiyum naklini uyarıcı etki yapar ve bu şekilde kalsiyum sarkoplazmik retikuluma taşınmış olur. Bu mekik mekanizma içerisinde kasılma ve gevşeme olaylarının normal olarak cereyan edebilmesi kalsiyum bağlayıcı proteinin kalsiyuma olan affinitesi ile regüle edilir. Zira proteinin affinitesinin kasılma sırasında düşük, istirahatte ise yüksek olduğu bildirilmiştir.

Bu çalışmada, PA'lerin separasyonu ve saflaştırılması, Gosselin-Rey ve Gerday'ın bildirdikleri metoda göre, Turna Balığı beyaz kasları üzerinde denenmiş, çalışma sonunda iki izotip saf olarak elde edilmiş ve metodun verimliliği hesaplanmıştır.

Bir proteini iyi bir şekilde saflaştırmak için çok sayıda metot bilmek yeterli değildir. Onların tek tek iyice incelenerek aralarından birinin seçilmesi ve elde edilen son ürünün saflığının uzun bir süre değişmediğinin kanıtlanması da gereklidir. Bunlara ilave olarak çeşitli uygulamalar sırasında yapılan harcamaların da hesaba katılmasında yarar görülmektedir.

Bu çalışmada Turna Balığının temizlenmiş beyaz kaslarından 40 g lık bir porsiyonla çalışmaya başlanmış ve sonuçta 19 mg PA III, 7 mg PA II izotipi liyofilize halde saf olarak elde edilmiştir. İzotiplerin saflığı 2 M üre varlığında % 7.5 Poliakrilamid gel üzerinde elektroforez ile doğrulanmıştır. Proteinler üzerinde aralıklarla tekrarlanan saflık ve aktivite testleri benzer sonuçlar vermiştir. Metodun verimliliği, izotipler açısından, tek tek hesaplanmış ve PA III için 475 mg / kg, PA II için 175 mg / kg taze kas olarak tesbit edilmiştir. Sonuçlar ilgili literatür bilgilerle (1, 3, 5) karşılaştırılmış ve uyum içerisinde bulunmuştur.

Bu sonuçlar ışığında, kullanılan metotla PA'lerin iyi bir şekilde saflaştırılabildiği ve verimliliğin yeterli sayılabilecek düzeyde olduğu kanısına varılmıştır. Diğer taraftan kasların total PA miktarı ve izotipleri yönünden farklılıklar göstermesinin ya da diğer bir ifade ile PA polimorfizminin, özellikle su ürünleri açısından, çeşitli verim özelliklerine sahip türlerin ortaya çıkarılması veya mevcutların muhafazasında yararlanılabilecek bir kriter olabileceği kanaati ortaya çıkmıştır.

## Kaynaklar

1. Bhusinana Rao, K.S.P., Focant, B., Gerday, Ch. and Hamoir, G. (1969). *Low molecular Weight proteins of Pike (Esox lucius) White muscles. II. Chemical and Physical properties.* Comp. Biochem. Physiol., 44B: 1113 - 1125.
2. Blum, H.E., Lehky, P., Kohler, L., Stein, E.A and Fischer, E.H. (1977). *Comparative properties of vertebrate parvalbumins.* J. Biol. Chem., 252: 2834 - 78.
3. Gerday, Ch. (1982). *Soluble Calcium-Binding Proteins from fish and invertebrate muscle.* Mol. Physiol., 2: 63 - 87.
4. Gerday, Ch and Gillis, J.M. (1976). *The possible role of parvalbumins in the control of contraction.* J. Physiol., 258: 96 - 97 P.
5. Goffard, Ph. (1985). *Concentration des parvalbumines dans les muscles de Grenouilles adaptées aux basses températures. Thèse du grade de licence en Education Physique.* IV + 57.
6. Gosselin - Rey, C and Gerday, Ch. (1977). *Parvalbumin frog From skeletal muscle (Rana temporaria L.): Isolation and characterization, Structural modification associated with calcium binding.* Biochim. Biophys. Acta., 492: 53 - 63.
7. Hsieh, J., Derancourt, J., Pechère, J.F. and Demaille, J. (1979). *Magnesium and calcium binding to Parvalbumins: Evidence for differences between parvalbumins and an explanation of their relaxing function.* Biochemistry., 13: 2752 - 2758.
8. Lehky, P. Blum, H.E., Stein, E.A. and Fischer, E.H. (1974). *Isolation and characterization of parvalbumins from the skeletal muscle of higher vertebrates.* J. Biol. Chem. 249: 4332 - 4334.
9. Pechère J.F. (1974). *Isolemeni d'une parvalbumine du muscle de lapin.* C.R. Acad. Sc. Paris., 278: 2577 - 2579.
10. Pechère, J.F., Derancourt, J. and Hsieh, J. (1977). *The participation of Parvalbumin in the activation-relaxation cycle of vertebrate fast skeletal muscle.* FEBS lett., 75: 111 - 114.