

## SIĞIR BÖBREK ALANİN AMİNOPEPTİDAZININ KISMEN SAFLAŞTIRILMASI, FİZİKOKİMYASAL VE KİNETİK ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI\*

Serenay Elgün\*\* • İsmail Hakkı Gökhan\*\*

### ÖZET

Siğir böbrek alanin aminopeptidazı 121.67 kat saflaştırılarak, bazı fizikokimyasal ve kinetik özellikleri incelenmiştir. Saflaştırma işlemi, homojenizasyon, amonyum sülfatla çöktürme ve Sephadex G-200 jel filtrasyon kromatografisi basamaklarını kapsamaktadır.

Kısmen saflaştırılan enzimle yapılan kinetik çalışmalar sonucunda enzimin L-alanil-β-naftilamid için Km değeri  $4 \times 10^{-5}$  M olarak belirlenmiştir. Enzimin fizikokimyasal özelliklerine ait deneyler sonucunda, optimum sıcaklık aralığı 37-50 °C, optimum pH aralığı ise 6-7.4 olarak bulunmuştur.

Enzim üzerinde bazı efektörler de denenmiş, bunlardan sisteinin kompetitif inhibisyon yaptığı, ferrik kloridin de inhibitör olduğu ama inhibisyon tipinin klasik tiplere uymadığı, tetrasiklinin ise enzim aktivitesi üzerine hiçbir etkisi olmadığı görülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** Alanin aminopeptidaz, Siğir böbreği

### SUMMARY

#### Partial Purification of Bovine Kidney Alanine Aminopeptidase

Bovine kidney alanine aminopeptidase was purified 121.67 fold and some of its physicochemical and kinetic properties were investigated. The purification procedure included homogenization, ammonium sulphate precipitation and Sephadex G-200 gel filtration chromatography.

Kinetic studies of the partially purified enzyme revealed the Km value for L-alanyl-b-naphthylamide to be  $4 \times 10^{-5}$  M. The enzyme had a pH optimum between 6 and 7.4, and optimum temperatures ranged from 37 to 50 °C.

Subsequently, some effectors were tried and among them, cystein and ferric chloride were found to be inhibitory, while tetracycline did not show any effect on the enzyme activity. Cystein acted as a competitive inhibitor, whereas the inhibition kinetics of ferric chloride was not similar to any of the classical inhibition types.

**Key Words:** Alanine aminopeptidase, Bovine Kidney

Alanin aminopeptidaz (EC 3.4.11.2.) insanda pek çok dokuda ve vücut sıvılarında bulunan aminopeptidazlardan birisidir. Alanin aminopeptidaz (AAP) tercihen N-terminalinde alanin bakiyesi bulunan doğal veya sentetik substratları hidroliz eder. AAP'ın ayrıca çeşitli biyolojik olarak aktif peptidleri hidroliz edebilme özelliği de vardır, örneğin; met-lys-bradikinin ve lys-bradikinin (1).

Enzim insanda hemen hemen üzerinde çalışılan her dokuda bulunmuştur. Bunlar arasında, karaciğer, pankreas, böbrek, kalp, ince barsak, meme, beyin, plasenta, mesane, kas, lenf nodları ve eritrositler sayılabilir. Böbrek ile ilgili ilk çalışma ise 1969'da Behal ve arkadaşları tarafından yapılmış, AAP insan böbreğinden saflaştırılmış ve erkeklerde idrarda bulunan

AAP aktivitesinin böbreğin yanı sıra, prostat veya seminal sıvıdan da kaynaklandığı yine aynı çalışmada ileri sürülmüştür (2). 1974'te insan böbreğinden yapılan biyokimyasal ve immünolojik bir çalışmada, AAP'ın böbrek korteksinde, γ-glutamiltanspeptidaz ve alkalen fosfataz ile birlikte proksimal tübüllerin fırçası kenar membranlarında yerleştiği bildirilmiştir (3)

AAP, genellikle, böbrek, karaciğer ve plasentada olduğu gibi membran fraksiyonlarında yer aldığı halde (1), iskelet kası (4), beyin (5) ve birçok kan hücresi ile onların progenitorlarında (6) sitoplazmik kompartmanda bulunmaktadır.

AAP'ın bugün için yapısı ve özellikleri aydınlatılmış olan izoformları, karaciğer, böbrek, duodenum, pankreas ve plasenta kökenlidir. İnsan böbrek AAP'ı

\* Bu makale aynı adlı tez çalışmasının kısaltılarak yazılmış şeklidir.

\*\* Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya A.B.D.

Behal ve arkadaşları tarafından saflaştırılmış ve idrarda bulunan AAP izoenzimlerinden birinin kadın ve erkekte ortak olan böbrekten, bir diğeri ise erkekte seminal sıvı ve prostat glandından köken aldığı bildirilmiştir (2). İnsan böbrek AAP'ının fiziksel ve kinetik özellikleri 1978'de Kao ve arkadaşlarınca araştırılmış ve enzimin sialik asit içeren bir glikoprotein olduğu bulunmuştur (7). Enzim, sialik asitin yanı sıra heksozlar ve glukozamin de içermektedir. Molekül kütlesi 236000 civarında olan bir dimerdir ve herbir monomer yaklaşık  $119500 \pm 7300$  Dalton ağırlığındadır. Aynı zamanda enzim, yapıda sıkı bağlı olarak çinko içeren bir metalloenzimdir. 1980 yılında yine böbrekten izole ve karakterize edilen AAP'ın yaklaşık 211000 Dalton'luk bir dimer olduğu ve iki identik alt birimi bulunduğu, yapının %17.4'ü kadar karbonhidrat içerdiği, aminoasit bileşimi incelendiğinde yüksek oranda aspartik asit, glutamik asit ve lösin, en az miktarda da sistein ve metiyonin içerdiği gösterilmiştir (8). 1990'da böbrek AAP'ının klinikteki yeri ve öneminden dolayı çalışmalar hızlanmış ve bu izoformun insan dokularında bulunan diğer izoformlarla aynı karakteristikleri taşıdığı ve genel hücresel protein katabolizmasında görev aldığı ileri sürülmüştür (9).

AAP ( $\alpha$ -aminoasit-peptid hidrolaz, arilamidaz, aminopeptidaz M, aminopeptidaz N) tercihen, N-terminalinde bir alanin bakiyesi bulunan doğal veya sentetik substratları hidroliz eder (1). Enzim aşağıdaki reaksiyonlardan ilkinin katalizlemektedir:

$L\text{-alanin-}\beta\text{-naftilamid} + H_2O \rightarrow L\text{-alanin} + \beta\text{-naftilamin}$

$\beta\text{-naftilamin} + NaNO_2 + H^+ \rightarrow \text{Diazo reaktifi}$

$\text{Diazo reaktifi} + N\text{-(1-naftil)-etilen diamin} \rightarrow \text{Mavi azo boyası}$

Substrat spesifikliği çalışmaları sonucunda, enzimin hem aminoasit- $\beta$ -naftilamid hem de aminoasit-p-nitroanilidli substratları hidrolizleyebildiği, en yüksek  $V_{max}$ 'ın da alanin- $\beta$ -naftilamid ile elde edildiği gösterilmiştir (2, 10, 11, 12, 13). Bugün için aktivite tayinlerinde en çok kullanılan substratlar alanin ve lösinin p-nitroanilidleri veya  $\beta$ -naftilamidleridir.

AAP'ın optimum pH'sı, tampona ve substrata bağlı olmak kaydıyla 6.5-8.5 arasında bulunmuştur (2, 3, 11, 14). Enzim 50 °C ve altında stabil iken, 50 °C'ın üzerinde aktivite giderek azalmakta, 70 °C'ta tamamen inaktive olmaktadır (8).

AAP'ın hücrelerdeki ve dolaşımdaki fizyolojik rolünü aydınlatmak için pek çok araştırma ve tahmin yapılmıştır. Enzimin, çeşitli peptid hormonların yapım ve yıkımı veya barsaktan emilen peptidlerin hidroliz-

den sorumlu olabileceği düşünülmüştür. Ayrıca, sialik asit taşıdığı için, hücre ve sirkülatuar immün yanıtta özellikle, spesifik hücre yüzey antijenlerinin antikor tarafından tanınmasında rol aldığı ve organizmanın hücrenin yabancı ajanlar tarafından işgaline karşı savunma mekanizmalarının gelişimine katıldığı sanılmaktadır (12). Yerleşik olan son görüş ise, enzimin, genel hücresel protein katabolizmasında son derece önemli bir role sahip olduğudur (9). Enzimin klinik biyokimyaadaki önemi, bu alanda yapılan ilk çalışmayla anlaşılmış ve AAP'ın pankreas başı kanserlerinin tanısında kullanılabileceği gösterilmiştir (15). Hepatobiliyer hastalıkların yanı sıra, AAP, renal hastalıklarda da tanı ve takipte kullanılmaktadır. İdrar AAP düzeyleri, pyelonefrit ve toksik böbrek harabiyetinde (16), nefrotik sendromun (17) ve renal hücreli karsinomların (18) tanı ve takibinde kullanılabilmektedir.

Böbrek hastalıklarının tanısında kullanılan ve renal fonksiyonun ölçümüne dayanan metodlar erken tanıda yeterince sensitif değildir. Bu nedenle günümüzde, bu soruna yönelik çalışmalar hızla sürmektedir. Biz de bu çalışmalara katkıda bulunması ve ileriki klinik çalışmalarımıza başlangıç oluşturması amacıyla bu çalışmayı planladık.

## MATERYAL ve METOD

Araştırma iki aşamada gerçekleştirilmiştir. Önce, siğir böbreğinden enzim izole edilerek saflaştırılmış, sonra da kinetik özellikleri incelenmiştir.

### A) Saflaştırma:

Bu amaçla, W. Sidorowicz ve arkadaşlarının kullandıkları metod kısmen modifiye edilerek uygulanmıştır (19).

1. Basamak: Siğir böbreği, soğuk serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra, yağ ve bağ dokuları ayrılmış ve küçük parçalar halinde kesilmiştir. Bundan sonra soğuk fosfat tamponu (0.01 M, pH=7.2) eklenerek, Waring blendorda 4-5 dakika süreyle homojenize edilmiştir. Bu ham homojenatın 400 mL.si ile deneye devam edilerek, filtrasyon uygulanmış, elde edilen filtratın 200 mL.si ile 2. Basamağa geçilmiştir.

2. Basamak: Filtrata, 4 °C'ta %80 doygunluğa erişecek şekilde amonyum sülfat eklenerek, 16 saat karıştırılmıştır. Santrifüj edildikten sonra, sediment alınarak minimum miktarda tamponla 148 mL.lik bir suspensiyon haline getirilmiştir.

3. Basamak: Suspensiyon, geçirgenliği 10000 g/mol olan diyaliz membranına konularak, pH=8 borat/NaCl (0.05 M: 0.05 M) tamponuna karşı 24 saat di-

yaliz yapılmıştır. Diyalizden sonra yapılan santrifüj (15000 devirde, 1 saat) sonrasında sedimentle devam edilmiştir.

4. Basamak: Bu aşamada, numune kolona uygulanarak jel filtrasyonuna tabi tutulmuştur. Jelin ıslatılması ve kolona doldurularak pH'sının ayarlanmasında yine pH = 8'lik borat/NaCl (0.05 M:0.05 M) tamponu kullanılmıştır. Bu amaçla Sephadex G-200 tipi jel kullanılmıştır. 2.5 × 60 cm.lik kolon jel ile doldurularak, kolon akış hızı 20 mL/saat olacak şekilde ayarlanarak, tamponla dengelenmiştir. Bundan sonra 2 mL. Numune kolona uygulanarak, toplam 1 L. Tampon geçirilmiştir. Kolondan çıkan eluatların absorbanları 280 nm. de tampona karşı okunarak, absorbanı yüksek olan fraksiyonlarda Lowry metodu (20) ile protein tayini yapılmış ve protein miktarı yüksek olan tüplerde de AAP aktivitesi tayin edilmiştir. Aktivitesi yüksek olan tüpler toplanıp birleştirilerek kısmen saflaştırılmış enzim numunesi elde edilmiştir. AAP tayini için Goldberg ve Rutenburg (15) ile Garner ve Behal'ın (14) metodlarına dayandırılan Sidorowicz'in modifiye spektrofotometrik metodu (19) kullanılmıştır. 37 °C'ta inkübasyondan sonra triklor asetik asitle reaksiyon durdurulur. L-alanil-β-naftilamidin hidrolizi sonucunda açığa çıkan β-naftilamin sodyum nitrit eklenerek diazo reaktifi elde edilir. N-(1-naftil)-etilen diamin dihidroklorür ile renklendirme yapılarak, 580 nm.de absorban okunur.

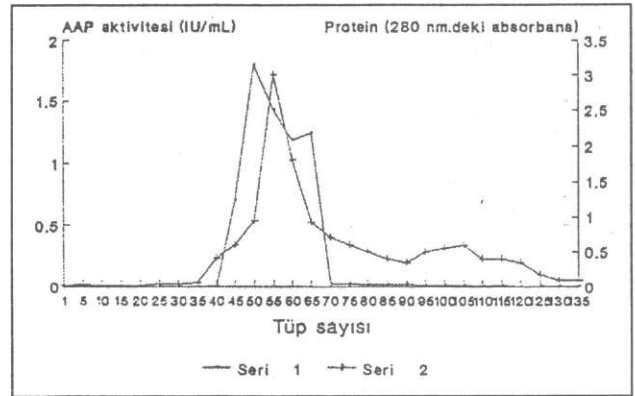
AAP aktivitesinin 1 Ünitesi, bu deney koşulları altında, 1 µmol substratı 1 dakikada hidroliz eden enzim miktarı olarak tarif edilir.

B) Saflaştırılan Enzimin Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi:

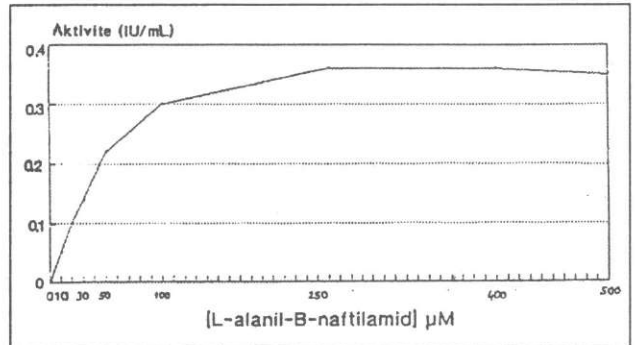
Kısmen saflaştırılan enzim kullanılarak L-alanil-β-naftilamid substratıyla Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek Km değeri hesaplandı. Ayrıca, sistein hidroklorür, ferrik klorid ve tetrasiklin hidroklorür gibi efektörlerle birlikte sıcaklık ve pH'nın enzim aktivitesine üzerine olan etkisi incelendi.

## SONUÇLAR

Şekil 1'de numunenin kolona uygulanmasından sonra kollektörde toplanan tüplerde okunan 280 nm.deki protein değerleri ile 580 nm.deki AAP aktiviteleri bir elüsyon profili şeklinde verilmiştir. Tablo 1'de ise sığır böbrek AAP'nın saflaştırma kademeleri ve her kademede elde edilen değerler gösterilmektedir. Şekil 2 ve 3, artan substrat konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi incelenerek çizilen Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafiklerine aittir, L-alanil-β-naftilamid için Km değeri  $4 \times 10^{-5}$  M olarak belirlenmiştir. Şekil 4 ve 5'te artan substrat konsantrasyonu



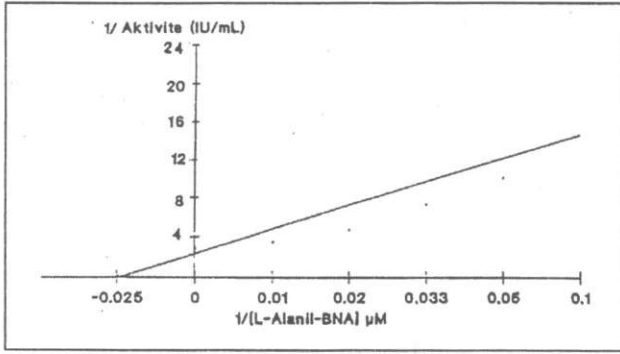
Şekil 1: AAP Sephadex G-200 elüsyon profili. (Seri 1–AAP aktivitesi (IU/mL), seri 2–280 nm.deki protein absorbanlarını göstermektedir.)



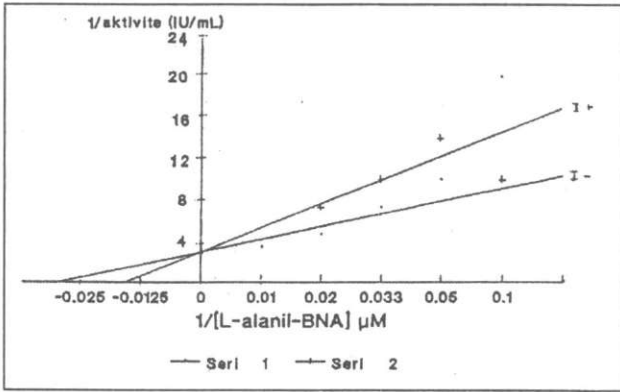
Şekil 2: L-alanil-β-naftilamid için Michaelis-Menten grafiği.

Tablo 1: Sığır böbrek AAP'nın saflaştırma basamaklarına ait sonuçlar.

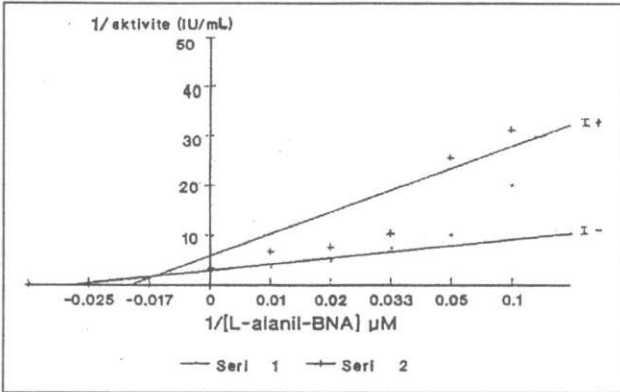
Saflaştırma basamağı	Hacim (mL)	Aktivite (IU/mL)	Protein (mg/mL)	Spesifik Aktivite (IU/mg)	Saflaştırma Oranı (%)
Ham homojenat	400	6.23	54	0.12	1
Santrifüj sonrası	380	4.45	24	0.19	1.58
Amonyum sülfat ve diyaliz sonrası	30	4.74	7	0.68	5.67
Sephadex G-200 kolon kromatografisi sonrası	33	0.73	0.05	14.6	121.67



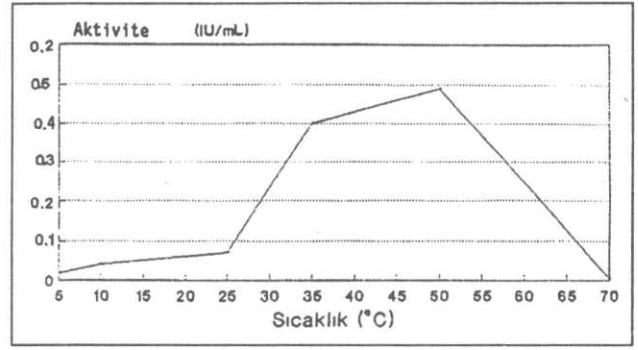
Şekil 3: L-alanil-β-naftilamid için Lineweaver-Burk grafiği.



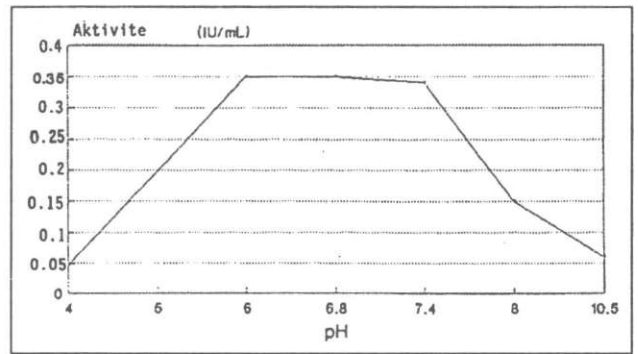
Şekil 4: Artan substrat konsantrasyonunda sistein için Lineweaver-Burk grafiği. (I - inhibitörsüz normal Lineweaver-Burk eğrisini, I + ise sisteinli eğriyi göstermektedir.)

Şekil 5: Artan substrat konsantrasyonunda ferrik klorid (FeCl<sub>3</sub>) için Lineweaver-Burk grafiği. (I - inhibitörsüz normal Lineweaver-Burk eğrisini, I + ise ferrik kloridli eğriyi göstermektedir.)

nunda enzim için birer inhibitör oldukları belirlenen sistein hidroklorür (AAP aktivitesini %50 inhibe eden sistein hidroklorür konsantrasyonu 200 μM olarak belirlenerek) ve ferrik klorid (AAP aktivitesini %50 inhibe eden ferrik klorid konsantrasyonu 200 μM olarak belirlenerek) için çizilen Lineweaver-Burk grafikleri verilmiştir. Tetrasiklin hidroklorürün ise AAP aktivitesi



Şekil 6: Sıcaklığın AAP aktivitesine etkisi.



Şekil 7: pH'nın AAP aktivitesine etkisi.

üzerine herhangi bir etkisi görülmemiştir. Sıcaklığın ve pH'nın enzim aktivitesi üzerine olan etkilerini incelemek için farklı sıcaklıklarda ve farklı pH'larda enzim aktivite ölçülmüş, sonuçlar Şekil 6 ve 7'de grafiklerle gösterilmiştir. Görüldüğü gibi, en yüksek aktivite 50 °C'ta bulunurken, +4 °C ve altında, 70 °C ve üzerinde aktivite giderek azalmaktadır. Enzimin optimum pH'sı da 6.8 olarak belirlenmiştir, pH=4 ve altında, pH=10.5 ve üzerinde aktivite hızla düşmektedir.

## TARTIŞMA

Bu çalışmada, AAP enzimi siğir böbreğinden kısmen saflaştırılmış, kinetiği ve fizikokimyasal özellikleri incelenmiş ve bazı efektörler denenmiştir. Bugüne kadar bu konuda yapılan çalışmalarda izolasyon ve saflaştırma için pek çok değişik metod kullanılmıştır (2, 8, 11, 19, 21). Bu metodların çoğunluğunda amonyum sülfat çöktürmesi ile birlikte jel filtrasyonu ve ardından iyon değiştirici kromatografi kullanılmıştır (7, 8, 11, 19, 21). Bu çalışmada ise, laboratuvar koşullarımıza uygun olan Sidorowicz'in kullandığı saflaştırma metodu (19) modifiye edilerek uygulanmış ve enzim kısmen saflaştırılabilmektedir. Aktivite tayininde ise yine Si-

dorowicz'in modifiye metodu (19) kullanılmıştır. Bu metod, literatürde saflaştırma ve kinetik deneylerde tercih edilen metoddur.

F.J. Behal ve M.N. Story, insan böbreğinden yaptıkları AAP saflaştırması sonucunda, enzimi 520 kat saflaştırarak jel filtrasyonu sonunda spesifik aktiviteyi 6.3, son basamak sonunda ise 52  $\mu\text{mol/dak./mg}$  protein olarak bulurken (2), Y.J. Kao ve arkadaşlarının, yine insan böbreğinde yaptıkları saflaştırmada, saflaştırma oranı 901, jel filtrasyonu sonunda spesifik aktivite 30.5, son spesifik aktivite ise 76.6  $\mu\text{mol/dak./mg}$  protein olarak saptanmıştır (7). 1980'de K. Hiwada ve arkadaşları, insan böbrek AAP'ını 266 kat saflaştırarak son basamak olan jel filtrasyonunda spesifik aktiviteyi 96.4  $\mu\text{mol/dak./mg}$  protein olarak bulmuşlardır (8). En yeni saflaştırma çalışmalarından birisi de, D. Mantle ve arkadaşlarının 1990'da insan böbreğinden yaptığı saflaştırmadır. Bu çalışmada, oran 789, iyon değiştirici ve jel filtrasyon kromatografisi sonucunda spesifik aktivite 80, son spesifik aktivite de 213.3  $\mu\text{mol/saat/mg}$  protein (3.56  $\mu\text{mol/dak./mg}$  protein)dir (9). Bizim yaptığımız izolasyon ve saflaştırma işlemleri sonucunda, enzim 121.67 kat saflaşmış, son basamakta, yani Sephadex G-200 ile yapılan jel filtrasyonu sonunda, enzimin spesifik aktivitesi 14.6  $\mu\text{mol/dak./mg}$  protein olarak bulunmuştur. Görüldüğü gibi fazla saflaştırma basamağı içeren çalışmalarda spesifik aktivite daha yüksek bulunmaktadır, bizim sonuçlarımız ise ilk çalışmaya yakındır.

F.J. Behal ve M.N. Story insan böbrek AAP'ı ile yaptıkları kinetik çalışmalar sonucunda L-alanil- $\beta$ -naftilamid için Km değerini  $5 \times 10^{-4}$  M (2) bulurken, Y.J. Kao ve arkadaşları  $1.23 \pm 0.12 \times 10^{-4}$  M (7), K. Hiwada ve arkadaşları ise  $8.7 \times 10^{-5}$  M (8) olarak bulmuşlardır. Bizim aynı substratla yaptığımız kinetik çalışmada Km değeri  $4 \times 10^{-5}$  M olarak saptanmıştır. Bu değer, Hiwada'nın bulduğuna oldukça yakındır. Farklılıkta ise doğal olarak, böbreğin kaynağı ve saflaştırma metodları ve oranları rol oynayabilmektedir.

Saflaştırılan enzimin fizikokimyasal özelliklerinin belirlenebilmesi amacıyla farklı sıcaklık ve pH değerleri denenmiştir. Enzimin 4 °C ve altında aktivitesi ~20 kat azalırken, 70 °C ve üzerinde kaybolmuştur. Sonuç olarak, böbrek AAP'ı için optimum aralığın 37-50 °C olduğu söylenebilir. Bu bulgular, 70 °C ve üzerinde enzimin hızla inaktive olduğunu gören Hiwada ve arkadaşlarının sonuçlarıyla uyumludur (8). AAP'ın optimum pH aralığını bulmak için yapılan deneyler

sonucunda, en uygun aralık pH=6-7.4, optimum pH ise 6.8 olarak bulunmuştur. Aktivite pH=4 ve altında, 10.5 ve üzerinde hızla düşmektedir. Buna göre sonuçlarımız optimum pH'yı 6.8 olarak bulan araştırmalarla benzeşmektedir (2, 11, 19).

Bundan sonra enzim aktivitesi üzerine sistein, ferrik klorid ve tetrasiklinin etkileri incelenmiştir. Her üç efektör de literatürde denenmemiştir. Sistein, sülfidril grubu taşıyan bir amino asittir ve benzeri kükürtlü bir amino asit olan metiyoninin enzimin inhibitörü olduğu (13) bilinmektedir. Bu bakımdan aktif bir sülfidril grubu taşıyan sisteinin enzim üzerinde ne gibi bir etkisinin olacağını görmek üzere denemeler yaptık ve sonuçta sisteinin enzimi kompetitif olarak inhibe ettiğini ve Ki değerinin 76  $\mu\text{M}$  ( $7.6 \times 10^{-5}$  M) olduğunu gördük. Sistein enzim üzerindeki sülfidril gruplarıyla reaksiyona girerek bir inhibisyon yapıyor olabilir, çünkü enzimin sülfidril gruplarını bloke eden ajanlar (22) ve sülfidril EDTA bileşikleri (23) ile inhibe olduğu bilinmektedir. Bir çalışmada da sülfidin de reversibl bir inhibitör olduğu ve karışık tipte bir inhibisyon kinetiği gösterdiği ancak mekanizmasının bilinmediği belirtilmiştir (24).

Ferrik klorid, enzim üzerinde bugüne kadar denenilen metaller arasında bulunmamaktadır. Genellikle enzimin aktif merkezinde bulunan  $\text{Zn}^{+2}$  gibi bivalent metaller denenmiş, kimisi inhibitör kimisi aktivatör olarak bulunmuştur. Biz +3 değerlikli bir metalin ne gibi bir etki yapacağını görmek amacıyla deney planladık ve sonuçta klasik inhibisyon tiplerine uymayan bir inhibisyon elde ettik. Ferrik klorid için Ki değeri 60  $\mu\text{M}$  ( $6 \times 10^{-5}$  M) olarak bulunmuştur.

Tetrasiklin, protein biyosentezini inhibe eden bakteriyostatik bir ajandır. Bu bakımdan ve ayrıca böbrekler üzerinden atıldığından böbrekteki enzim sentezini bloke edebilir. Ancak bu etkiyi görebilmek için in vivo bir çalışma planlanmalıdır. Öte yandan, tetrasiklinlerin, bazı hastalarda protein yıkılımını hızlandırarak, kilo kaybı ve nitrojen retensiyonuna yol açtığı bilinmektedir (25). AAP da, peptidlerin amino terminalinden yıkılımında görev alan bir ekzopeptidaz olduğundan, tetrasiklinlerin, bu kademede enzim üzerinde muhtemelen aktivatör etkiyle yıkılımı hızlandırabileceği düşünülebilir. Ancak, ortama tetrasiklin ekleyerek yapılan deneylerde, tetrasiklinin enzim üzerinde herhangi bir yönde etkisi görülmemiştir.

## KAYNAKLAR

1. Sanderink GJ, Artur Y, Siest G. Human aminopeptidases. *J Clin Chem Clin Biochem* 1988; 26: 795-807
2. Behal FJ, Story MN. Arylamidase of human kidney. *Arch Biochem Biophys* 1969; 131: 74-82
3. Scherberich JE, Falkenberg FW, Mondorf WA ve ark. Biochemical and immunological studies on isolated brush border membranes of human kidney cortex and their membrane surface proteins. *Clin Chim Acta* 1974; 55: 179-197
4. Lauffart B, Mantle D. Rationalization of aminopeptidase activities in human skeletal muscle soluble extract. *Biochim Biophys Acta* 1988; 956: 300-306
5. Mantle D, Lauffart B, Perry EK ve ark. Comparison of major cortical aminopeptidase activity in normal brain and brain from patients with Alzheimer's disease. *J Neuro Sci* 1989; 89: 227-234
6. Razak K, Newland AC. The significance of aminopeptidases and hematopoietic cell differentiation. *Blood Rev* 1992; 6: 243-250
7. Kao YJ, Starnes WL, Behal FJ. Human kidney alanine aminopeptidase: Physical and kinetic properties of a sialic acid containing glycoprotein. *Biochemistry* 1978; 17: 2990-2994
8. Hiwada K, Ito T, Yokoyama M ve ark. Isolation and characterization of membrane-bound arylamidases from human placenta and kidney. *Eur J Biochem* 1980; 104: 155-165
9. Mantle D, Lauffart B, Dermott J ve ark. Characterization of aminopeptidases in human kidney soluble fraction. *Clin Chim Acta* 1990; 187: 105-114
10. Sidorowicz W, Zownir O, Behal FJ. Action of human pancreas alanine aminopeptidase on biologically active peptides: Kinin converting activity. *Clin Chim Acta* 1981; 111: 69-79
11. Behal FJ, Little GH, Klein RA. Arylamidase of human liver. *Biochim Biophys Acta* 1969; 178: 118-127
12. Starnes WL, Behal FJ. A human liver aminopeptidase. The amino acid and carbohydrate content and some physical properties of a sialic acid containing glycoprotein. *Biochemistry* 1974; 13: 3221-3227
13. Lampelo S, Lalu K, Vanha-Perttula T. Characterization of three aminopeptidases purified from human placenta. *Placenta* 1983; 4: 499-513
14. Garner CW, Behal FJ. Effect of pH on substrate and inhibitor kinetic constants of human liver AAP. Evidence for two ionizable active center groups. *Biochemistry* 1975; 14: 5084-5088
15. Goldberg JA, Rutenburg AM. The colorimetric determination of leucine aminopeptidase in urine and serum of normal subject and patients with cancer and other diseases. *Cancer* 1957; 11: 283-291
16. Fujita K. Urinary AAP activity in various urinary tract diseases. *Hinyokika Kyo* 1984; 30: 1417-1419
17. Guszczynski T, Bednorz R, Morawska Z. Activity of alanine aminopeptidase, beta-glucuronidase and N-acetyl-beta-D-glucosaminidase in urine of children with nephrotic syndrome. *Pol Tyg Lek* 1991; 46: 753-754
18. Kitamura Y, Watanabe M, Kamatsubara S ve ark. Urinary excretion of glycine-prolyl dipeptidyl aminopeptidase, N-acetyl-beta-D-glucosaminidase, alanine aminopeptidase and low molecular protein in patients with renal cell carcinoma. *Hinyokika Kyo* 1990; 36: 535-539
19. Sidorowicz W, Jackson GC, Behal FJ. Multiple molecular forms of human pancreas alanine aminopeptidase. *Clin Chim Acta* 1980; 104: 169-179
20. Lowry OH, Rosebrough J, Farr AL ve ark. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275
21. Little GH, Behal FJ. Human liver arylamidase: Molecular weight and subunit structure. *Biochim Biophys Acta* 1971; 243: 312-319
22. Mantle D, Hardy MF, Lauffart B ve ark. Purification and characterization of the major aminopeptidase from human skeletal muscle. *Biochem J* 1983; 211: 567-573
23. Tsushima H, Sumi H, Ikeda H ve ark. Low molecular weight alanine aminopeptidase of human serum: Separation and some characteristics. *Biomed Biochim Acta* 1990; 49: 327-338
24. Garner CW, Behal FJ. Human liver aminopeptidase: Role of metal ions in mechanism of action. *Biochemistry* 1974; 13: 3227-3233
25. Neu HC. Chemotherapy of infections. In: Braunwald E, Isselbacher KJ, Petersdorf RG et al. Eds. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 11th ed. Hamburg: Mc Graw-Hill Book Co., 1987: 497-498