

Alkalen Fosfataz Enziminin Fizikokimyasal Özellikleri

PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF ALKALINE PHOSPHATASE

Nesrin UZUNOĞLU*

*Dr.Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya AD, Araştırma Görevlisi, ANKARA

Alkalen fosfataz enzimi tüm dünyada bilim adamlarının ilgisini çekmekte ve bu konu üzerine yoğun araştırmalar yapılmaktadır. Alkalen fosfatazlar bugüne kadar bir çok araştırmacı tarafından farklı canlı türlerinin değişik organ ve dokularından saflaştırılmış ve fizikokimyasal özellikleri incelenmiştir. Enzim üzerinde yapılan fizikokimyasal ve kinetik çalışmalarla birbirinden farklı izoenzimlerin varlığı ortaya konmuştur (1). Farklı hastalıklarda farklı izoenzimlerin tespit edilmesi ve tanıda, tedavinin izlenmesinde klinisyene önemli bilgiler sağlaması nedeniyle bu enzimin fizikokimyasal özelliklerine olan ilgi artmıştır (2).

Fosfatazlar fosforik asit esterlerinin hidrolitik parçalanmasını katalizleyen enzimlerdir. Optimal aktivite gösterdikleri pH bölgesine göre asit fosfatazlar ve alkalen fosfatazlar olmak üzere ikiye ayrılır. Alkalen fosfatazlar alkalın pH'da maksimum aktivite gösteren fosfatazları kapsamaktadır ve farklı bir çok enzimi içermektedir (3,4).

Çeşitli hayvansal dokulardan elde edilen alkalen fosfatazlar 40.000-200.000 Dalton arasında değişen farklı molekül ağırlığına sahiptir. E. coli al-

kalen fosfataz'ı molekül ağırlığı 40.000 ve 45.000 olan iki monomerden oluşmaktadır (5). Plasental alkalen fosfataz ise molekül ağırlığı 116.000 ve 58.000 olan iki monomerden oluşmaktadır.

Alkalen fosfataz aktif bölgede iki Zn^{+2} iyonu ve bir Mg^{+2} iyonu bulundurur ve dimerik yapıdadır. Alkalen fosfataz membrana bağlı bir metalloenzimdir (2,6,7). Bu enzimin prostetik grubunu Zn oluşturmaktadır. Zn enzimin katalitik aktivitesi için önemlidir ve substrat bağlanmasında rol alır (6,8).

Alkalen fosfatazların molekül ağırlığı gibi moleküler yapıları da birbirinden farklılık göstermektedir. Bununla beraber hepsi glikoprotein yapısındadır (6,8). Enzimin aktif bölgesinde serin bakiyesi bulunmakta ve enzimin reversibl fosforilasyonunu sağlamaktadır (6). E. coli alkalen fosfatazında serin etrafındaki aminoasit dizisi asparajin-serin-alanin şeklindedir. İnsan plasental alkalen fosfatazın aminoasit bileşimi %50 oranında non-polar aminoasitlerden oluşmaktadır. Alkalen fosfatazların karbonhidrat içerikleri de farklılık göstermektedir. Plasental alkalen fosfatazında fukoz, mannoz, galaktoz bulunmaktadır (9). Normalde alkalen fosfataz önemli miktarda sialik asit içermektedir. İnsan karaciğer, kemik, plasenta alkalen fosfatazlarında sialik asit bulunurken ince bağırsak alkalen fosfazında sialik asit bulunmamaktadır. Karaciğer alkalen fosfatazında bulunan sialik asit

Geliş Tarihi: 07.11.1996

Yazışma Adresi: Dr.Nesrin UZUNOĞLU
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyokimya AD, ANKARA

bu enzimin aktivitesini regüle etmektedir (4). E. coli alkalen fosfataz enziminin yapısı ve fonksiyonları daha detaylı olarak bilinmektedir (5,6). Günümüzde E. coli mutasyonu ve E. coli alkalen fosfatazı konusundaki araştırmalar ağırlık kazanmıştır (8,10,11). Alkalen fosfatazın üç boyutlu yapısı x-ray kristallografi ile tespit edilmiştir (12). Farklı araştırmacılar aynı doku için farklı sonuçlar elde ettiğinden alkalen fosfatazların bazı özellikleri hala kesin olarak öğrenilememiştir. Alkalen fosfatazın moleküler yapısı hakkındaki araştırmalar devam etmektedir (13).

Sistemik Adlandırılması ve Bulunduğu Yerler

Uluslararası Biyokimya Birliği'nin (IUB) adlandırma sistemine göre alkalen fosfataz enziminin sistematik adı; ortofosforik monoester fosfohidrolaz (alkalen optimum) E.C.3.1.3.1'dir.

Alkalen fosfatazlar tabiatta çok yaygın olarak bulunurlar. Enzim insan ve hayvan dokularının hemen hemen hepsinde, bazı bitki türlerinde, balıklarda, bakteri ve mantarlarda bulunmaktadır (1,7). Alkalen fosfataz enzimi 20. yüzyılın başlarında ilk defa pirinçten izole edilmiştir. Alkalen fosfataz enziminin bulunduğu doku ve organlar; karaciğer, ince bağırsak, pankreas, kemik, tiroid bezi, plasenta, meme glandı, diş minesini, seminifer tubuller, lökosit hücre membranı, endoplazmik retikulum, mitokondri, nükleus zarı, hücre membranı (4,14,15,16). Alkalen fosfataz enzimi absorptiv hücrelerin dış yüzeylerinde bulunur ve transport sürecinde yardımcı olur. Hücre membranının aktif transportunu regüle eden bir enzim olduğu düşünülmektedir. Alkalen fosfataz enziminin kemik oluşumunda önemli rolü vardır ve osteoblastlarda bulunur, ortamın pH'sını alkali tutarak pirofosfatların çözünür halde bulunmasını ve mineral çökmesini sağlar (16). Alkalen fosfataz aktivitesi karaciğer, kemik, bağırsak, böbrek ve plasentada en yüksektir. Kemikleşmiş kartilaj zengin fosfataz kaynağı olarak bilinmektedir (4,17).

İzoenzimleri

Alkalen fosfataz'ın 11 farklı izoenzimi serumda tespit edilmiştir (4). Elektroforez, ısı ile inakti-

vasyon, üre ile inhibisyon, kimyasal inhibisyon ve immünokimyasal metodlarla alkalen fosfataz 8'den fazla izoenzime ayrılmaktadır. Fakat normal şartlarda bir şahsın serumunda en fazla 4 izoenzim tespit edilebilmektedir. Bunlar; kemik, karaciğer, ince bağırsak, plasental izoenzimleridir. Böbrek izoenzimine ise serumda pek rastlanmamaktadır (17,18).

Alkalen fosfatazın başlıca izoenzimleri

Karaciğer izoenzimi; insan serumunda molekül ağırlığı 80.000 olan iki subunitin solubl homodimeri olarak bulunmaktadır (2).

Kemik izoenzimi; dolaşımda solubl dimerik formda bulunur (2).

Bağırsak izoenzimi; sağlıklı kişide serumda solubl değildir, hidrofobiktir, heterojen yapıdadır. Membrana bağlı bağırsak alkalen fosfataz aktivitesi normal duodenal sıvıda çok yüksektir (2).

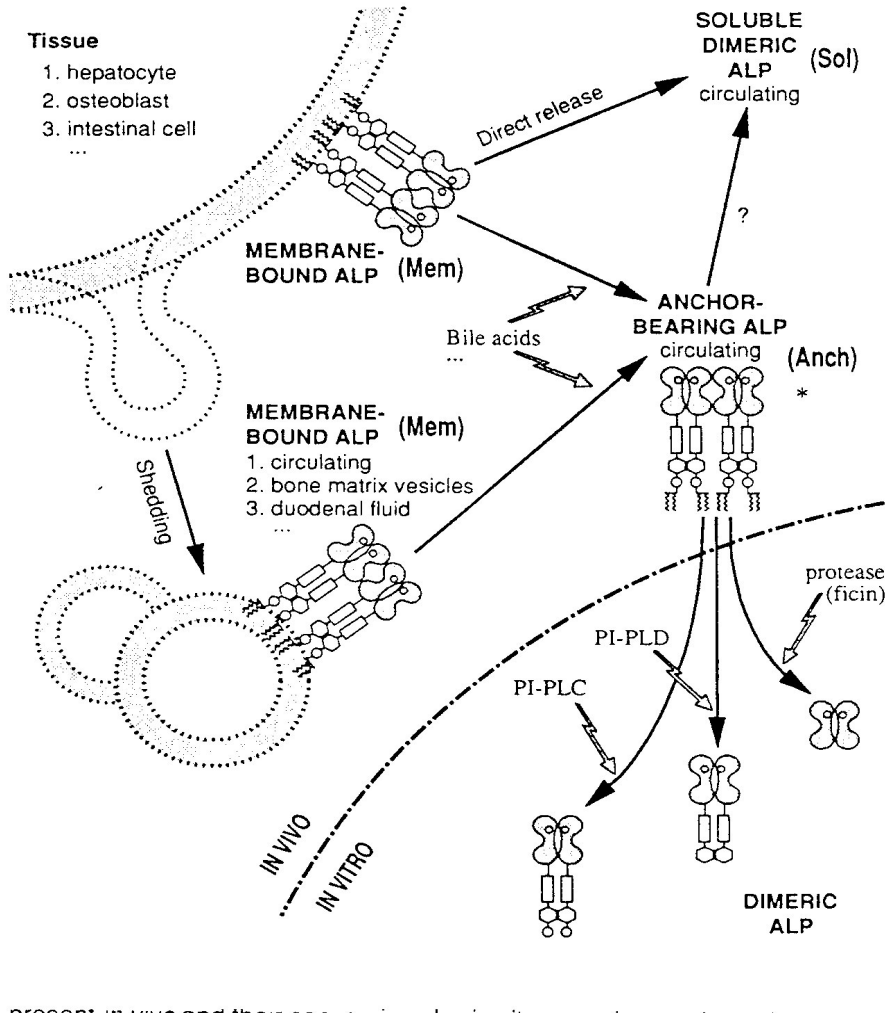
Fetal intestinal izoenzim; amniotik sıvıda ve mekonyumda bulunmaktadır. İnsan serumunda fetal intestinal alkalen fosfatazın bulunması çok nadirdir (2).

Plasental izoenzim; insan serumunda iki formda bulunur. Solubl dimerik form ve heterojen heterojen hidrofobik formdadır (2) (Şekil 1).

Lökosit izoenzimi; normal lökositlerde 2 tip alkalen fosfataz bulunmaktadır; termolabil ve termostabil formda. Lökosit alkalen fosfatazı granülosit matürasyon marker'ı olarak dikkate alınır ve akut faz reaktanı olarak değerlendirilir. Lökosit alkalen fosfatazı biyokimyasal ve immünolojik özellikler açısından karaciğer, böbrek ve kemik alkalen fosfatazları ile aynıdır (2,19).

Kanserli dokulardan kaynaklanan izoenzimler; Regan, Nagao, Kasahara izoenzimleridir ve çeşitli kanserlerde serumda bulunurlar (17,18). Regan izoenziminin özellikleri plasental izoenzime benzer. Son yapılan araştırmalar da Regan ve Nagao izoenzimlerinin polipeptid yapılarının %88'nin homoloji gösterdiği 12 aminoasitlik kısmın ise değiştiği bulunmuştur (20).

Alkaleen fosfataz'ın çeşitli invivo formları ve invitro deneylerde değişimi



Şekil 1. Alkaleen fosfatazın çeşitli formlarının invivo yer alışı ve invitro deneyler ile değişiminin şeması (2).

Invitro deney: Jel kromatografisi sonuçları.

Sol: Solubl dimerik karaciğer, kemik, bağırsak, plasental alkaleen fosfatazları.

Anch: anchor-bearing karaciğer, kemik, bağırsak, plasental alkaleen fosfatazları (farklı formlar).

Mem: Membrana bağlı karaciğer, kemik, bağırsak alkaleen fosfatazları.

Alkaleen fosfataz izoenzimlerinin ayırımında çeşitli metodlar kullanılır. Isı ile denatürasyon ve aminoasitler ile spesifik inhibisyon en eski yöntemlerdir ve alkaleen fosfatazın fizikokimyasal özelliklerine dayanarak geliştirilmiştir (Tablo 1). Jel kromatografisi izoenzimlerin ayırımında kullanılabilir. Fakat rutin laboratuarda kullanıma uygun bir teknik değildir. Rutinde izoenzim ayırımı için HPLC kullanımı tarif edilmiştir. Alkaleen fosfataz izoenzimlerinin tayininde son zamanlarda kullanılan metod-

lar immünokimyasal tekniklere dayanmaktadır. İmmünokimyasal teknikler elektroforezden daha sensitiftir. Kemik alkaleen fosfatazın tayini için geliştirilen son yıllardaki çalışmaların odaklandığı spesifik metod lektin ile kemik izoenzimün presipitasyonudur ve son zamanlarda çok merkezli çalışmalarla değerlendirilmiştir. Bu tekniğin dezavantajı ise yalnız kemik izoenzimini ölçmesi ve diğer izoenzimler hakkında bilgi vermemesidir. (2,18,21). İzoenzimlerin ayırımında elektroforez

Tablo 1. Alkalen fosfataz izoenzimlerinin fizikokimyasal metodlarla ayrımı (2).

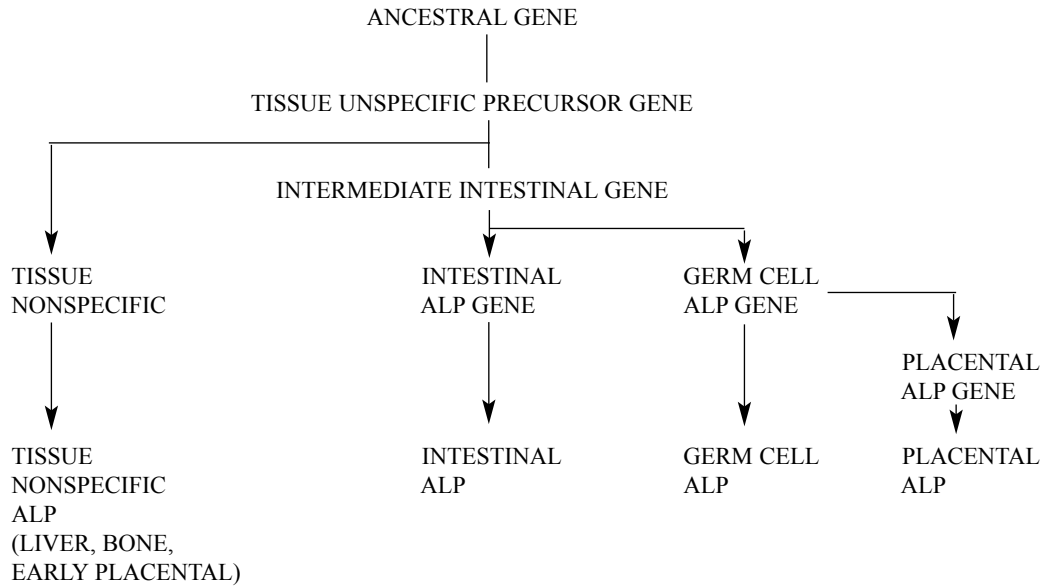
	kemik	karaciğer	intestinal	plasental	Germ-cell
10 dak. 56°C	++	+	+	-	-
10 dak. 65°C	++	++	+	-	-
Üre	++	+	+/-	-	-
L-fenilalanin	-	-	+	+	+
L-triptofan	-	-	+	+	-
L-homoarginin	++	++	-	-	-
L-lösin	-	-	-	-	++
Levamisol	++	++	-	-	-

-: inhibisyon
 +: orta derecede inhibisyon
 ++: güçlü inhibisyon

tekniki de kullanılmaktadır. Elektroferezde en hızlı göç eden izoenzim karaciğer izoenzimidir. Bu ilk bandın ardından kemik dokusuna ait izoenzimin bandı gelir. Üçüncü olarak daha yavaş göç eden bağırsak izoenzimin verdiği band görülür. Elektroferez tekniği karaciğer ve kemik izoenzimlerinin ayrımına olanak vermeyen bir yöntemdir. Günümüzde agaroz elektroferez izoenzimlerin ayrımında kullanılmaktadır. İki dimensionlu elektroferez izoenzim çalışmasında kullanılmaktadır. Fakat rutin kullanıma uygun değildir. İzoelektrik focusing tekniği ile ise alkalen fosfataz en az 10-20 farklı banda ayrılmaktadır (3,16,18,21,22). Kemik ve karaciğer izoenzimlerinin katalitik özellikleri çok az farklılık göstermektedir. Halbuki ısı ve üre ile inaktivasyonları farklıdır. Üre ile inaktivasyon

ısı ile inaktivasyona benzer. Isı ve üre inaktivasyonu irreversibl kinetik reaksiyonlardır ve zamana bağlıdır (3,21). Üre ile sadece karaciğer izoenzimi aktive olurken diğer izoenzimler inaktive olmaktadır (18). Alkalen fosfataz ısı ile denatürasyona uğratıldığında kemik, karaciğer, bağırsak ve plasenta izoenzimlerine ayrılır. Isıya en dayanıksız olan izoenzim kemik alkalen fosfatası, en dayanıklı olan izoenzim ise plasental alkalen fosfatadır. Regan izoenzimi de ısıya dayanıklıdır (3,20). Plasental izoenzim 65°C'de 30 dak. bekletildiğinde aktivitesinde bir değişiklik olmamakta, bu ısıda diğer izoenzimler aktivitelerini tam olarak kaybetmektedir (3).

Serumda normal yeni doğan ve çocuklarda dominant tip kemik büyümesi ile ilgili olarak

**Şekil 2.** Alkalen fosfataz gen ailesi (2).

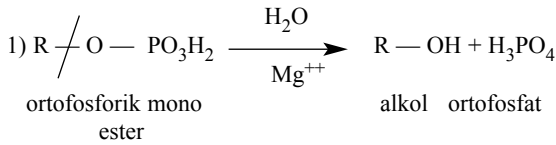
kemik izoenzimi iken, yetişkinlerde dominant tip karaciğer izoenzimidir (18,22). Gebeliğin 3. trimesterinde ise plasental izoenzim anne kanında bulunur. Özellikle 0 ve B kan grubu olanlarda daha sık olmak üzere normal kişilerin %20'sinde ince bağırsak izoenzimi serumda bulunur (3,23).

Doku alkale fosfatazları moleküler yapı ya da genetik faktörden ileri geldiği düşünülen fiziko-kimyasal farklılıklar göstermektedir (24). Alkale fosfataz izoenzimlerinin sentezi çeşitli gen lokuslarından kontrol edilmektedir. Plasental izoenzim 2. kromozomda, karaciğer-kemik-böbrek izoenzimleri ise 1. kromozomdan kontrol edilmektedir. Non-spesifik doku alkale fosfatazları (karaciğer, kemik, böbrek), ince bağırsak, plasental ve germ cell alkale fosfatazları en az 4 farklı gen lokusunda kontrol edilmektedir. Non-spesifik doku geni'nin post-translasyonel modifikasyonu ile kemik ve karaciğer alkale fosfatazları oluşmaktadır (2) (Şekil 2).

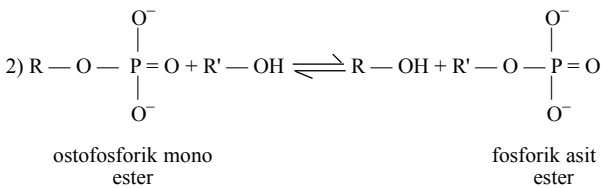
Katalitik Özellikleri ve Etki Mekanizması

Alkale fosfataz alkali pH'da fosfat esterlerinin çoğundan inorganik fosfatı serbestleştirmektedir (2,6,25). Enzimin aktivitesi için lizinin ϵ -NH₂ grubu, sistem'in SH grubu ve çinko iyonu gereklidir. ϵ -NH₂ grubu enzime substrat bağlanmasında, SH ve çinko ise katalitik aktivitede rol almaktadır. Alkale fosfataz fosfat esterleri ve fosfoproteinlerden inorganik fosfatı hidrolitik olarak ayırmaktadır. Alkale fosfataz enzimi aşağıdaki 3 reaksiyonu katalizlemektedir (17,26):

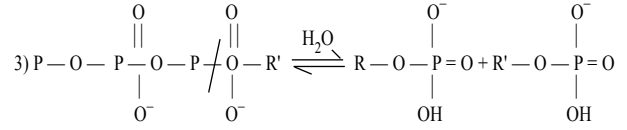
Enzimin parçaladığı bağlar "/" işareti ile belirtilmiştir.



Enzim burada hidrolaz olarak görev alır (12). P-O bağlarını parçalayarak inorganik ortofosfat açığa çıkarır. Mg⁺⁺ katalizde enzimi aktive edici rol alır (27,28)

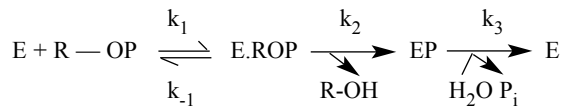


Bu transfosforilasyon reaksiyonudur. Enzim burada fosfotransferaz olarak rol almaktadır (27).



Burada enzim pirofosfat (P-O-P) bağlarını hidroliz ederek pirofosfat aktivitesi göstermektedir.

Etki mekanizması: Enzimin etki mekanizması aşağıdaki şekilde 2 kademede oluşur (2,6,7).



E: serbest enzim.

E. P: fosforillenmiş enzim

R—OP: substrat

E. ROP: enzim substrat kompleksi.

1. kademede; reaksiyonda enzim-substrat kompleksi oluşmakta sonra substrat hidrolizi ile fosforillenmiş enzim ve ürün oluşmaktadır.

2. kademede; fosforillenmiş enzimden hidroliz ile serbest enzim ve Pi açığa çıkmaktadır.

Enzimin katalitik aktivitesi, substrat türü ve konsantrasyonuna, pH'ya, aktivatör ve inhibitörlerin konsantrasyonuna, enzim miktarına, tampon tipine göre değişmektedir (18).

Substratları

İnsan doku alkale fosfatazları substratlara karşı farklı afinite gösterir (2). Enzimin substrat spesifikliği düşüktür. İnsan doku alkale fosfatazlarının tipik substratları; primer ve sekonder alkollerin fosfat esterleri, şeker alkoller ve fenollerin fosfat esterleri, nükleozid monofosfatlardır.

Alkale fosfataz aktivite tayinlerinde en çok kullanılan substratlar: β -gliserofosfat, fenil fosfat, p-nitrofenil fosfat, naftil fosfat, fenol fitaleyin fosfat, timol fitaleyin fosfatdır (18). P-nitrofenil fosfat en yaygın kullanılan substrattır.

Kemik alkale fosfataz'ının substratları; hekzofosfat, gliserofosfat, etil fosfat, adenilat fosfat, fenil fosfat, fosfomononükleotiddir. Böbrek alkale fosfataz'ının substratları; fosfomonoesterler, fosfodiesterler, fosfoamidat, metafosfattır. Plasental alkale fosfatazın substratları ise; 5'. AMP, ATP, UMP,UTP, ADP, PP_i, α -gliserofosfat ve p-nitrofenil fosfatdır.

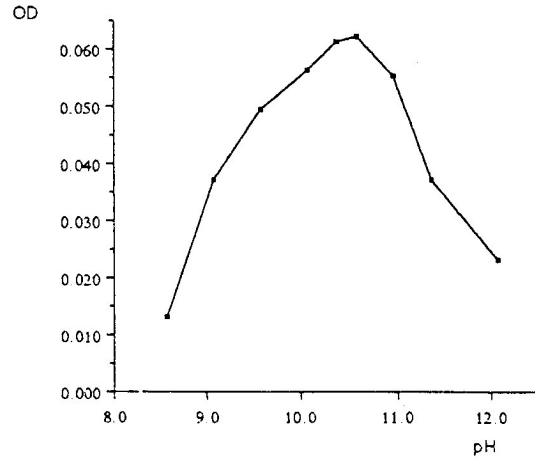
Alkalen fosfatazların tabii substratı bilinmemektedir (4,18).

Enzimin Stabilitesi

Çeşitli doku alkalen fosfatazlarının sıcaklığa karşı stabiliteleri farklıdır (18). Isıya en dayanıklı tip plasental izoenzimdir ve 70°C'de 30 dak. bekletildiğinde stabil kalmaktadır. Bu sıcaklıkta diğer izoenzimler stabilitesini kaybetmektedir (18). Isıya en az dayanıklı olan izoenzim ise kemik alkalen fosfatazıdır. Serum alkalen fosfatazı +4°C'de 20 gün, -20°C'de dondurulduğunda birkaç ay stabil kalmaktadır. Saf enzime çinko ilave edilince (0,2 mM) -20°C'de bir yıl stabil kalmaktadır. Çinko ilave edilmediğinde ise -20°C'de hızla aktivite kaybetmektedir. Serum 56°C'de ısıtılınca kemiğe ait enzim %90-100 oranında, karaciğer ve bağırsak enzimi %50-60 oranında aktivite kaybetmektedir. Buna karşılık plasental ve Regan izoenzim 30 dak. stabil kalmaktadır (16). 56°C ve 65°C enzimlerin sıcaklıkla denatürasyonunda sınır derecelerdir. Bu sıcaklık derecelerindeki denatürasyon izoenzimlerin tiplendirilmesinde kullanılan önemli bir kriterdir. Enzim 37°C'de maksimum aktivite gösterir (1,18).

Alkalen fosfataz alkali ve nötral pH'da stabildir, asit pH'da stabilitesini kaybeder. Alkalen fosfatazlar pH = 7'nin üstünde aktivite gösterir (1). Çeşitli dokulardan elde edilen alkalen fosfatazların optimum pH'ları farklıdır. İnsan karaciğer alkalen fosfatazı için optimum pH = 10.2'dir (1). İntestinal alkalen fosfatazı için optimum pH = 7.35'dir (29). Sığır karaciğer alkalen fosfatazı pH = 10.5'da maksimum aktivite göstermektedir (Şekil 3) (1). Çeşitli çalışmalarda substrat konsantrasyonunun azalması ile optimal pH'nın azaldığını tespit edilmiştir (2). Sığır ince bağırsak alkalen fosfatazı üzerinde yapılan araştırmada ısı ve pH'nın artırılmasıyla enzimin α -heliks yapısının bozulduğu görülmüştür (30).

Alkalen fosfatazların ortamdaki üreye karşı da stabiliteleri farklıdır (18). Plasental izoenzim 8 M üre ile 7 saat sonra %50 oranında aktivite kaybederken, 3 M üre ile kemik izoenzimi 7 dak. sonra %50 oranında inhibe olmaktadır. İntestinal tip ise orta derecede stabilite göstermektedir (17).



Şekil 3. pH'nın enzim aktivitesine (sığır karaciğer alkalen fosfatazı) etkisi (1).

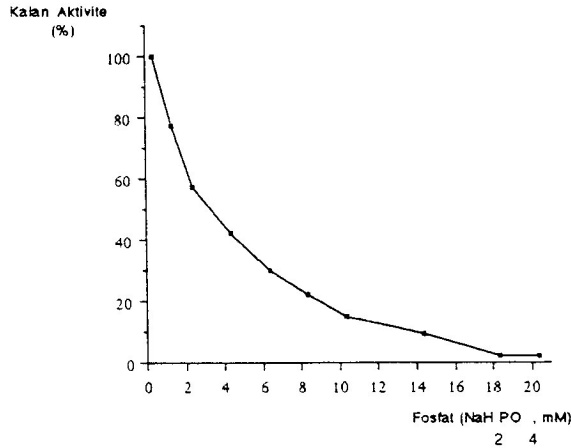
İnhibitörleri

Alkalen fosfatazın inhibitörleri; metal şelatı oluşturan maddeler, bazı +2 değerli katyonlar, ortofosfat ve benzeri polivalan anyonlar olmak üzere 3 grup da toplanmaktadır. Metal şelatı oluşturan maddelerin başında EDTA gelmektedir (31,32). Sistein, α -dipiridil, fenantrolin'de metal şelatı yapmaktadır. Bu maddeler enzimin yapısındaki çinko ile şelat yaparak alkalen fosfatazı kuvvetle inhibe etmektedir. Zayıf etkili metal şelatı oluşturan maddeler histidin, siyanür, iyodobenzoat, iyodoasetamid, serindir ve bunlar yüksek konsantrasyonda inhibisyon yapar.

İnhibitör etkili +2 değerli metal iyonlar; Be, Cd, Ni, Sn, Hg, Fe'dir (18,32). Zn^{++} düşük konsantrasyonlarda (10^{-6} M) aktivatör etkili olmasına rağmen 10^{-4} M'da inhibitör etkilidir. Polivalan anyonlar; poli östradiol fosfat, polifluoretan fosfattır ve böbrek ile bağırsak izoenzimini kuvvetle inhibe eder. Arsenat, pirofosfat, borat, oksalat, karbonat, vanadat'da enzimin inhibitörleridir (18).

Taurokolat karaciğer, kemik, böbrek alkalen fosfatazını inhibe etmekte, L-fenil alanin ise bağırsak, plasenta, Regan izoenzimlerini kuvvetle inhibe etmektedir (21). Alkalen fosfatazın tüm izoenzimleri fosfat tarafından kompetitif tipte inhibe edilir (1). Şekil 4'de değişen fosfat konsantrasyonlarının enzim aktivitesine etkisi verilmiştir.

Aminoasitlerin yalnız L- formları enzimin zayıf inhibitörleridir, D- formları ise etkisizdir. L-ho-



Şekil 4. Değişen fosfat konsantrasyonlarının enzim aktivitesine (sığır karaciğer alkale fosfatası) etkisi (1).

moarginin, L- triptofan, L-fenil alanin intestinal ve plasental alkale fosfatazlarını inhibe eder (1,2,21). Levamizol ve imidazol karaciğer, kemik izoenzimlerini ankompetitif tipde inhibe eder (17,18). Alfostatın karaciğer izoenzimini, triptofan ise plasental izoenzimi inhibe eder (Tablo 1). İnsan karaciğer alkale fosfatası üzerine yapılan çalışmada 2 M üre enzimi %60 oranında, 3 M üre ise enzimi %90 oranında inhibe ettiği, 4 M ürenin ise enzimi tamamen inaktif hale geçirdiği tespit edilmiştir (1).

Aktivatörleri

Alkale fosfataz enziminin en önemli aktivatörü Mg²⁺ iyonudur (28,33). Reaksiyon ortamına Mg²⁺ iyonunun ilave edilmemesi aktiviteyi %50 oranında düşürür. Mn⁺⁺, Co⁺⁺ enzimin aktivatörleridir. İnce bağırsak alkale fosfatası için spesifik aktivatör sodyum deoksikolat'dır. Zn⁺⁺ düşük konsantrasyonlarda enzimi aktive etmektedir (33). Düşük konsantrasyonda üre substrat olarak fenil fosfat kullanılması halinde karaciğer izoenzimini aktive eder.

KAYNAKLAR

- Türköz Y, Üstüdal M. Sığır karaciğer alkale fosfatasının saflaştırılması, fizikokimyasal ve kinetik özelliklerinin araştırılması. Optimal Tıp Dergisi 1994; 7 (1): 31-7.
- Van Hoof VO, De Broe ME. Interpretation and clinical significance of alkaline phosphatase isoenzyme patterns. Crit. Rev. Clin. Lab Sci 1994; 31(3): 197-293.
- Henry JB. Clinical diagnosis and management by laboratory methods. Nineteenth edition. WB Saunders Company, 1996: 276-8.
- Kaplan LA, Pesce AJ. Clinical chemistry theory, analysis and correlation. Third edition. Baltimore, Boston, Chicago, Newyork, London, Madrid, Mexico City, Singapore, Tokyo, Toronto. Mosby. 1996: 514-5.
- Murphy JE, Xu X, Kantrowitz ER. Conversion of a magnesium binding site into a zinc binding site by single aminoacid substitution in Escherichia coli alkaline phosphatase. J Biol Chem 1993; 268(29): 21497-500.
- Coleman JE. Structure and mechanism of alkaline phosphatase. Annu Rev Biophys Biomol Struct 1992; 21: 441-83.
- Simonopoulos T, Jencks W. Alkaline phosphatase is an almost perfect enzyme. Biochemistry 1994; 33: 10375-80.
- Ma L, Kantrowitz ER. Mutations at histidine 412 alter zinc binding and eliminate transferase activity in Escherichia coli alkaline phosphatase. J Biol Chem 1994; 269(50): 31614-9.
- Eguchi M. Alkaline phosphatase isozymes in insects and comparison with mammalian enzyme. Biochem Mol Biol 1995; 111(2): 151-62.
- Ma L, Tibbitts TT, Kantrowitz ER. Escherichia coli alkaline phosphatase: x-ray structural studies of mutant enzyme (His-412→Asn) at one of the catalytically important zinc binding sites. Protein Sci 1995; 4(8): 1498-506.
- Dealwis CG, Brennan K. Crystallographic analysis of reversible metal binding observed in a mutant (Asp 53→Gly) of Escherichia coli alkaline phosphatase. Biochemistry 1995; 34(13): 13967-73.
- Labow B, Herschlag D, Jencks WP. Catalysis of the hydrolysis of phosphorylated pyridines by alkaline phosphatase has little or no dependence on the pKa of the leaving group. Biochemistry 1993; 32(34): 8737-41.
- Moss DW. Perspectives in alkaline phosphatase research. Clin Chem 1992; 38(12): 2486-96.
- Klump S, Schultz JE. Alkaline phosphatase from pramecium cilia and cell bodies. Purification and characterisation. Biochem Biophys Acta 1990; 1037 (2): 233-9.
- Sakharov İYU, Makasova I, Ermolin GA. Purification and characterisation of intestinal alkaline phosphatase from harp seal. comp. Biochem Physiol 1988; 90(4): 709-14.
- Kumandaş S, Kurtoğlu S. Çocukluk döneminde alkale fosfataz enziminin değerlendirilmesi. Yeni Tıp Dergisi 1992; 9(1): 68-70.
- Calbreath FD. Clinical chemistry a fundamental textbook. WB Saunders Company. 1992: 186-90.
- Tietz N.W. Textbook of clinical chemistry. Second edition. Philadelphia, London, Toronto, Mexico City, Rio de Janerio, Sydney, Tokyo, Honkong. WB Saunders Company. 1994: 830-43.
- Anal Ö, İrken G. Düşük doğum ağırlıklı bebeklerde kordon kanı lökosit alkale fosfataz skorları. Dokuz Eylül Üniv. Tıp Fakültesi Dergisi 1994; 8(1): 37-40.

20. Canoruç N, Canoruç F, Özden T, Şen C. Gastrointestinal sistem kanserlerinde sialik asit ve alkalen fosfatazın serum düzeyleri ve tanıdaki önemleri. *Gastroenteroloji* 1993; 4(4): 656-60.
21. Gültepe M, Bülbül M. Quantitative determinations of alkaline phosphatase isoenzymes by chemical inactivation and its application to automation. *Tr J of Medical Sciences* 1993; 18(1): 23-9.
22. Moss DW. Alkaline phosphatase isoenzyme. *Clin Chem* 1982; 28(10): 2007.
23. Bayer PM. Intestinal alkaline phosphatase and the ABO blood group system. *Clin Chim Acta* 1980; 108-813.
24. Miura M, Sakagishi Y. Differences between the sugar moieties of the liver and bone type alkaline phosphatase: Re evaluation. *Ann Clin Biochem.* 1994; 31(pt 1): 25-30.
25. Tibbits TT, Kantrowitz ER. Kinetics and crystal structure of a mutant *Escherichia coli* alkaline phosphatase (Asp 369→Asn): a mechanism involving one zinc per active site. *Protein Sci* 1994; 3 (11): 2005-14.
26. Varley H. Practical clinical biochemistry. Vol I, William Heineman Books Lim, 1980.
27. Han R, Coleman JE. Dependence of the phosphorylation of alkaline phosphatase by phosphate monoesters on the pKa of the leaving group. *Biochemistry* 1995; 34(13): 4238-45.
28. Janeway CM, Xu X, Murphy JE. Magnesium in the active site of *Escherichia coli* alkaline phosphatase is important for both structural stabilization and catalysis. *Biochemistry* 1993; 32 (6): 1601-9.
29. Nametkin SN, Kabanov AV, Levashov AV. Alkaline phosphatase from calf intestinal mukoza in reversed micelle systems. Modulation of enzyme membrane activity by pH variation. *Biochem. Mol. Biol Int* 1993; 29 (1): 103-11.
30. Dela fourniere L, Nosjean O. Thermal and pH stabilities of alkaline phosphatase from bovine intestinal mukoza: a FTIR study. *Biochem Biophys Acta* 1995; 1248 (2): 186-92.
31. Mersol JV, Steel DG, Gafhi A. Detection of intermediate protein conformations by room temperature tryptophan phosphorescence spectroscopy during denaturation of *Escherichia coli* alkaline phosphates. *Biopsy Chem* 1993; 48(2): 281-91.
32. Shan Y, Mckelvie ID, Hart BT. Characterisation of immobilised *Escherichia coli* alkaline phosphatase reactors in flow injection analysis. *Anal Chem* 1993; 65(21): 3053-60.
33. Ciancaglioni P, Pizavro JM, Leone FA. Polyoxyethylene 9-lauryl ether - solubilized alkaline phosphatase: Synergistic stimulation by zinc and magnesium ions. *Int J Biochem* 1992; 24(4): 611-5.