

## KOBAY LENSİ GLUKOZ-6-FOSFAT DEHİDROGENAZININ KINETİK ÖZELLİKLERİ

Sezer Yarımağan \*

Konçuy Mergen \*\*

(Dergiye geliş tarihi : 2 Temmuz 1976)

### ÖZET

G6PD (Glukoz - 6 - Fosfat Dehidrogenaz) enzimi elektroforetik olarak tek bant verecek şekilde saflaştırıldıktan sonra kinetik özellikleri incelendi. Enzimin her iki sübratı için  $K_m$  değerleri ve kataliz hızına iyonların pH'nın ve inhibitörlerin etkileri incelendi.

### SUMMARY

Glucose - 6 Phosphat dehydrogenase from quinea pig lens has been purified and kinetic properties studied. The effect of pH, inhibitors, and various ions on  $K_m$ 's for both substrates have been studied.

Inhibitors used were : Phospholin iodid, pycocorpin, substrate analogs such as glucose, glucose - I - phosphate, glucose - I,6 di phosphate and fructose 6 - phosphate; steroids and fatty acids.

Ions used were :  $Mg^{++}$ ,  $Ca^{++}$ ,  $PO_4^{--}$ ,  $Ba^{++}$ , and  $Fe^{++}$ ,

X - Dihydroandrostane,  $3\beta$  - OH - 5 androstane 17 - on, and caproic acid were the most effective inhibitors of the enzyme.

$Ca^{++}$ ,  $Ba^{++}$ , and  $Fe^{++}$  affected the rate of enzyme by replacing  $Mg^{++}$ .

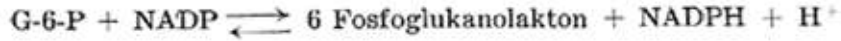
(\* ) Dr. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi

(\*\*) Dr. Biyokimya Araştırma Bilim Dalı

## GİRİŞ :

Pentoz fosfat metabolik yolu nükleotid sentezi için gerekli ribozlar ile steroidlerin hidrosillenmesi, yağ asidi, kolesterol sentezi ve glutasyonun indirgenmesi için gerekli NADPH'nın sağladığı ana metabolik yollardan biridir.

Bu metabolik yolun başlangıcında bulunan G-6-PD şu reaksiyonu katalizler.



Enzim aktivitesi ilk olarak 1931 yılında Warburg ve Christian (1) tarafından at eritrositlerinde gösterilmiştir. Daha sonra çeşitli araştırmacılar çeşitli dokulardan saflaştırmağa muvaffak olmuşlardır (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12).

G-6-PD aktivitesi çeşitli memeli türleri arasında en yüksek Kobay lensinde (6, 12) bulunduğu için bu çalışmada tercih edilmiştir.

## GEREÇ VE YÖNTEM :

Kullanılan kimyasal maddeler «Sigma Chemical Co. ve BDH» firmalarından temin edilmiştir.

Kobay lens'leri H.Ü. deney hayvanları laboratuvarından sağlanmıştır.

Enzim aktivitesi ölçülmesinin esası 340 m $\mu$  da NADPH oluşumuna bağlı absorbans değişikliğinin incelenmesidir (13).

Milletler arası enzim ünitesi : (I.Ü) 25°C de dakikada bir  $\mu$ M NADP indirgiyen enzim miktarı bir ünitedir (14).

Enzimin saflaştırılması Peterson, Sober (15) ve Andrews (16) in yöntemleriyle selüloz asetat elektroforezinde tek bant verme kriterine göre yapıldı. Bu saf enzimin kinetik özellikleri incelendi.

## BULGULAR

G-6-P için  $K_m$  :

NADP  $4 \times 10^{-4}$  M da sabit tutulup G-6-P konsantrasyonu  $100 \times 10^{-6}$  -  $6,25 \times 10^{-6}$  M arasında değiştirilerek saptandı. (Şekil 1a)

NADP için  $K_m$

G-6-P  $2 \times 10^{-3}$  M da sabit tutulup NADP konsantrasyonu  $50 \times 10^{-6}$  M -  $3,125 \times 10^{-6}$  M arasında değiştirilerek saptandı Şekil 2 a.

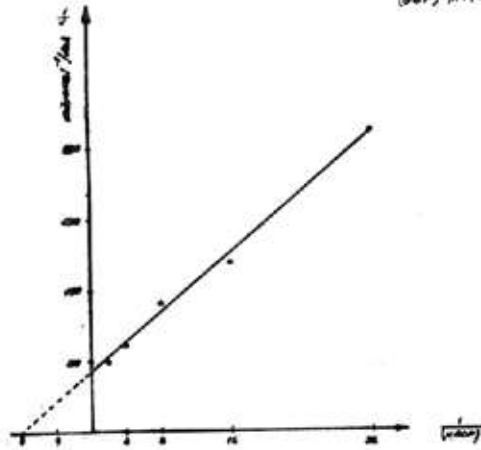
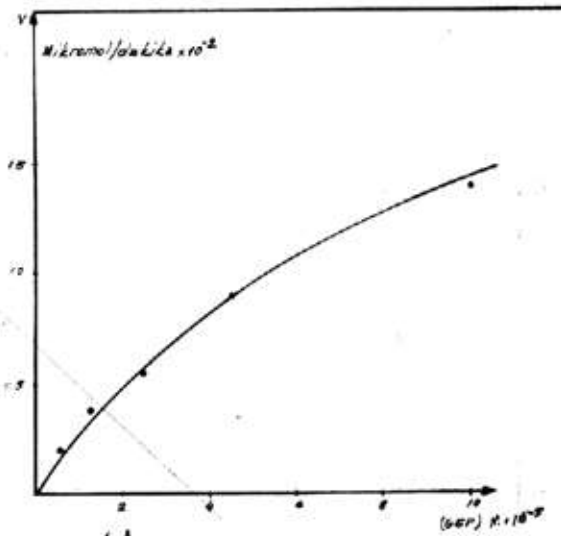
Hız ölçümleri üçlü gruplar halinde 12 şer kez tekrarlandı.

pH 8 ve  $25^{\circ}\text{C}$  de son  $\text{Mg}^{++}$  derişimi  $1,4 \times 10^{-2}$  M iken G-6-P için  $K_m = (32,6 \pm 0,2) \times 10^{-6}$  M

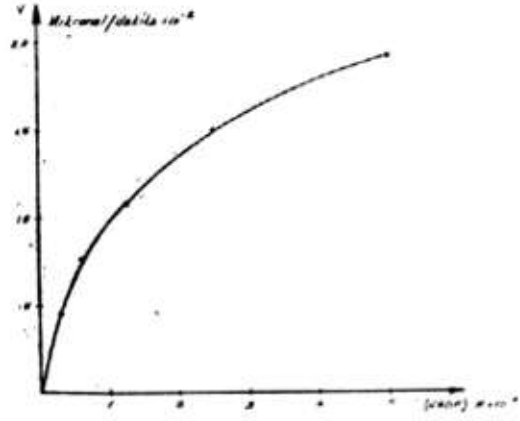
NADP için  $K_m = (12,5 \pm 0,1) \times 10^{-6}$  M olarak bulundu.

Şekil 1 b - 2 b ise her iki substrat için Lineweaver Burk grafiklerini göstermektedir.

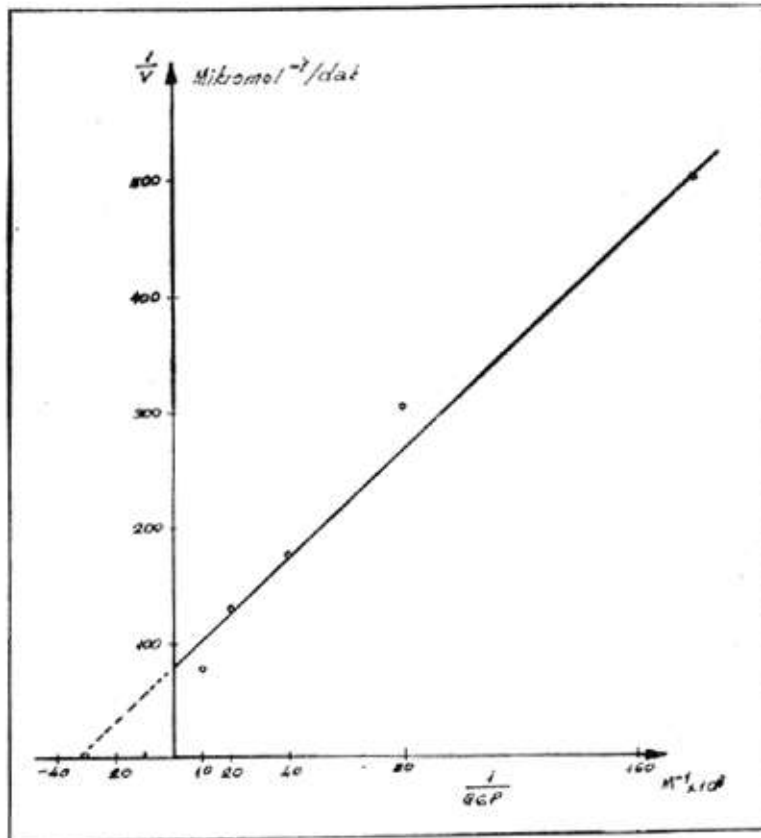
Şekil 1 a



Şekil 1 b



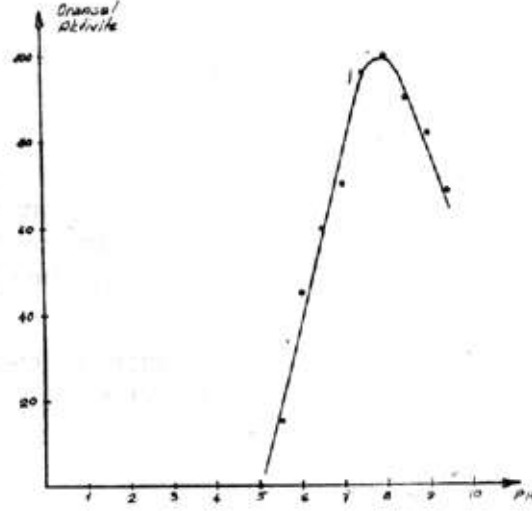
Şekil 2 a



Şekil 2 b

**pH nin enzim kataliz hızına etkisi :**

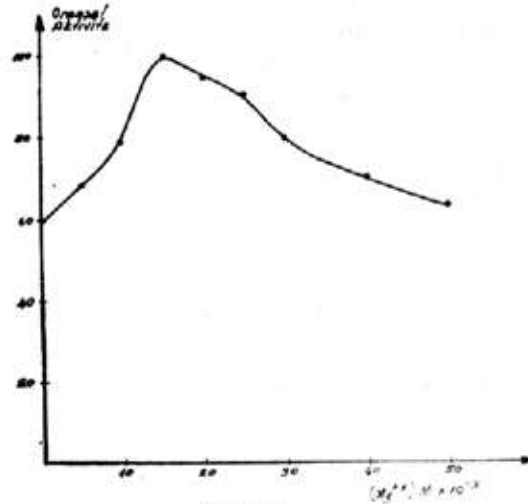
Saf enzimin kataliz hızına pH nin etkisi pH 5-10 arasında incelendi (Şekil 3). Bütün ölçümler 25°C den  $1,4 \times 10^{-2}$  M  $MgCl_2$  ile yapıldı. pH 5 de G-6-PD inaktifdi pH 9,5 olduğunda ortama konulan  $MgCl_2$  hidrosit şeklinde çöktüğünden ölçüm yapılamadı.



Şekil 3

**Değişen  $Mg^{++}$  konsantrasyonlarının enzimin kataliz hızına etkisi :**

$Mg^{++}$  G6PD aktivitesi için gereklidir. Kataliz tepkimesinin hızı  $Mg^{++}$  konsantrasyonu  $1,5 \times 10^{-2}$  M iken en fazladır.  $0,5 \times 10^{-2}$  M altında ve  $3 \times 10^{-2}$  M üstünde hızla düşer (Şekil 4) (19).



Şekil 4

#### **Diğer iyonların enzim kataliz hızına etkisi :**

Deney ortamının  $10^{-3}$  M G-6-P,  $10^{-3}$  M NADP,  $1,4 \times 10^{-2}$  M  $Mg^{++}$  ihtiva ettiği şartlarda pH 8 ve  $25^{\circ}C$  de  $Ca^{++}$  enzim aktivitesi % 22  $Ba^{++}$  % 16,  $Fe^{++}$  % 3 oranında inhibe etti.

#### **İnhibisyon deneyleri :**

Kortikosteroidler- $\beta$ -metazon ve prenizolone disodium fosfat denendi. Konsantrasyon  $3 \times 10^{-2}$  M kadar çektiği halde bir inhibisyon gözlenmedi.

Antikolin esterazlar-glokom tedavisinde kullanılan ve güçlü bir antikolin esteraz olan fosfolin iodidin konsantrasyonu : 1'e kadar artırıldığı halde G-6-PD inhibe etmedi. Gene bir miotik ve kolin esteraz inhibitörü olan pilokorpin  $2 \times 10^{-2}$  M derişime kadar inhibisyon etkisi yapmadı.

Belirtilen derişimlerin üzerine çıkıldığında inhibisyon gözlendi ise de bu inhibisyonlar ortama konan inhibitör miktarı ile orantılı değildi.

**Sübrat Benzerleri :** Safılaştırılan kobay lensi G6PD'ı NADP'ye tam özgül olup NAD'yi hiç indirgemedi.

G6P'ın benzeri olarak G, GIP, GI6DP, F6P denendi. Enzim G6P'a tam özgül olup sübratlar derişimleri kullanılan G6P derişiminin 10 katına çıktığı zaman bile yükseltgemedi.

**Sen Ürün İnhibitörleri :** Bazı steroid hormonlar ve yağ asitleridir. Steroit hormonlardan : Dehidro androsteron, pregnenolon ve 3 B-OH-5 $\beta$ -androstan-17-on denendi, ve kobay lensi G6PD'ı için çok kuvvetli inhibitörler olduğu gözlendi. Bu steroidlerin Ki değerlerini bulmak için pH = 8,0; son ( $Mg^{++}$ ) :  $1,4 \times 10^{-2}$  M; son (NADP) :  $4 \times 10^{-4}$  M (doyunluk derişimi) sabit tutulup; (G6P) :  $100 \times 10^{-6}$  M -  $6,25 \times 10^{-6}$  M arasında değıştirildi ve inhibitör varlığında enzimin kataliz hızı incelendi.

Yağ asitlerinden asetik (2 C), bütirik (4 C), miristik (14 C), palmitik (16 C), stearik (18 C) ve oleik (18 C), asitler sodyum tuzları halinde denendi ve inhibitör etki göstermediler. 10 karbonlu doymuş yağ asidi olan kaprik asit sodyum tuzu halinde kullanıldı ve kobay lensi G6PD si için inhibitör olduğu gözlendi. Tablo I belirtilen koşullarda üç inhibitör steroid ve sodyum kaprata ait Ki değerlerini vermektedir.

<b>İnhibitör</b>	<b>İnhibitör Derişimi</b>	<b>Deney sayısı</b>	<b>Ki ± standart sapma</b>
Dehidroandrostan	10 <sup>-4</sup> M	12	(1,70 ± 0,04) 10 <sup>-4</sup> M
3B-OH-5-andostan-17-on	2 x 10 <sup>-6</sup> M	12	(2,13 ± 0,07) (10 <sup>-6</sup> M)
Pregnenolon	10 <sup>-5</sup> M	12	(7,40 ± 0,34) 10 <sup>-6</sup> M
Sodyum kaprat	10 <sup>-3</sup> M	6	(2,20 ± 0,12) 10 <sup>-3</sup> M

TABLO I — G6PD'in son ürün inhibitörlerinin Ki değerleri :  
(G6P) değişken; (NADP) = 4 x 10<sup>-4</sup> M;  
(Mg<sup>++</sup>) = 1,4 x 10<sup>-2</sup> M; pH = 8,0; 25°C

### TARTIŞMA

G6PD başta insan alyuvarları 6 olmak üzere insan akyuvarları (17), insan plesentası (18), rat kası, yağ dokusu ve karaciğeri (8, 7, 19), rat meme bezi (9, 10), sığır adrenal korteksi (11), maya (2, 13), asetobakter ksilinum (20) gibi bir çok türlerin değişik dokularından kısmen saflaştırılmış ve özellikleri incelenmiştir.

1966 da Hackwin ve arkadaşları sığır lensinde karbonhidrat metabolizması ile ilgili 8 ayrı enzimin aktivitelerini ölçmüş ve yaşlanmış lenslerde bütün dehidroge nazların azaldığını göstermişlerdir (21). Aynı araştırmacıların 1968 de yaptıkları bir çalışmada çözünebilir protein miktarı ile birlikte G6PD nin azaldığı bulunmuştur (22).

Enzim 686 kere saftır ve başlangıçtan beri verim 5,37 % dir. Saflaştırılmış G6PD nin selüloz asetat elektroforezi yapıldı numune oldukça saf ve kinetik çalışmalar için uygundur.

Yöntemler kısmında belirtilen tamponlarla pH'nın enzim kataliz hızına etkisi incelendiğinde kataliz hızının pH = 8,0 de en yüksek olduğu bulundu. Bu değer insan alyuvarları (6) rat, karaciğeri (7, 9), koyun lensi (12) gibi bir çok dokulardan elde edilen G6PD için bulunan pH değerinin aynıdır. pH 9,5 iken ortama konan MgCl<sub>2</sub>, Mg(OH)<sub>2</sub> olarak çöktüğünden ölçme yapılamadı.

Enzimin kataliz hızı  $1,2 \times 10^{-2}$  M -  $2,5 \times 10^{-2}$  M MgCl<sub>2</sub> varlığında en yüksektir, bu değerlerin dışında hızla düşer.

Ca<sup>++</sup>, Ba<sup>++</sup> ve Fe<sup>++</sup>Mg<sup>++</sup> yerine geçtiklerinden bu iki değerlikli katyonların varlığı kataliz hızını azalttı.

Saflaştırılmış kobay lensi G6PD'sinin pH = 8,0 ve  $1 \times 10^{-1}$  M Mg<sup>++</sup> varlığında K<sub>m</sub> değerleri :

G6P için K<sub>m</sub> = (32,6 ± 0,2) 10<sup>-6</sup> M

NADP için K<sub>m</sub> = (12,5 ± 0,1) 10<sup>-6</sup> M olarak saptandı.

Bu değerler koyun lensi G6PD si için bulunan K<sub>m</sub> lerin aynıdır. Tablo II de değişik memeli dokuları ve mikroorganizmalardan saflaştırılan G6PD lerin K<sub>m</sub> değerleri görülmektedir.

1935 de Theorell (23) ve 1955 de Glaser ve arkadaşları (24) fosfatın insan akyuvar G6PD sinin inhibe ettiğini belirtmişlerse de bizim çalışmamızda  $10^{-2}$  M -  $8 \times 10^{-1}$  M arasında KPO<sub>4</sub> inhibitör etki göstermedi.

**TABLO II** Çeşitli türlerden saflaştırılan G6PD'lerin K<sub>m</sub> değerleri :

G6PD	G6P için K <sub>m</sub> (10 <sup>-6</sup> M)	NADP için K <sub>m</sub> (10 <sup>-6</sup> M)
İnsan alyuvarları	50—78	2,9—4,4
İnsan akyuvarları	16	8,1
Sığır adrenal korteksi	42	5,6
Rat yağ dokusu	35	1,7
Rat kası	34	2,1
Rat karaciğeri	48	1,1
Maya	35	2,8
Asetobakter ksilinum	2500	40
Koyun lensi	32	12

1960 da Black ve arkadaşları kortikosteroid tedavisi sırasında katarakt oluşumunun hızlandığını belirtmişler ve deneysel katarakt oluşumunun hızlandığını belirtmişler ve deneysel katarakt denemeleri yapmışlardır (4). 1971 de M. Charlton ve arkadaşları ise yük-



sek derişimde prednizolon disodyum fosfat ve  $\beta$ -metazon disodyum fosfatın koyun lensi G6PD si için inhibitör olduğunu göstermiştir (12) Kobay lensi G6PD si ise 30 nM derişimde bile bu kortikosteroidlerle inhiye olmadı. Gene 1971 de Charlton ve arkadaşlarının inhibitör olarak belirttiği pilokorpin ve fosfolin iodid 25 nM derişime kadar inhibitör etkisi göstermediler.

1970 de R. Raineri ve arkadaşları rat meme bezinden (10) 1973 de Richard W. Geisler rat karaciğer, kas ve yağ dokusundan (7) gene 1973 de Benziman ve arkadaşları asetobakter ksilinumdan (20) saflaştırdıkları G6PD'lerin sübstrat olarak hem NADP hem NAD yi kullanabildiğini belirtmişlerdir. Kobay lensi G6PD si ise NADP ye tam özgül olup NAD yi indirgemedi.

G6PD nin steroidlerle inhiye olduğu ilk kez 1960 da Marks ve Banks tarafından gözlenmiştir (25). Aynı araştırmacılar daha sonraki çalışmalarında maya G6PD sinin steroidlerle inhiye olmadığını, bu özelliğin memeli enzimine ait olduğunu açıkladılar.

Memeli G6PD'sinin steroidlerle inhibisyonu 1961 ve 1963 de Levy ve arkadaşları (26, 27) 1970 de R. Raineri ve arkadaşları tarafından incelenmiştir (10). Raineri kullandığı 18 steroidin yapısı ile inhibisyon gücü arasında bir bağlantı kurmuş 17 veya 20. karbondan bir keto grubu bulunmasının inhibisyon için gerekli olduğunu ve steroidin yapısı düzlemsel (Planar) oldukça inhibisyon gücünün arttığını belirtmiştir. Bu yapıya en uygun bileşik 5- $\beta$ -androstan-17-on'dur. Gene bu araştırmacıya göre enzim üzerinde hidrofobik bir cep vardır, bu cep steroid bağlama bölgesi olarak iş görür (10).

Bizim çalışmamızda inhibitör olarak kullanılan 3 steroid arasında 3-hidroksi-5-androstan-17-on'un kuvvetli bir G6PD inhibitorü olduğu saptandı. Bu bulgu R. Raineri'nin sonuçları ile bağdaşmaktadır.

1960 da Marks ve Banks tarafından dehidroandrosteron'un insan aykuvar G6PD sinin güçlü bir inhibitör olduğunu bildirmiş ancak inhibisyon kinetikleri ve Ki değerleri çalışılmamıştır (25).

Bizim çalışmamızda da dehidro androsteron kobay lensi G6PD sini inhiye etti ve  $K_i = 1,70 \pm 0,04$  M bulundu. Kullanılan diğer iki steroidin Ki değerleri ise Raineri'nin rat meme bezi için bulduğu Ki lerle karşılaştırmalı olarak aşağıda verilmiştir.

	<b>A</b>	<b>B</b>
	<b>Ki (10<sup>-6</sup> M)</b>	<b>Ki (10<sup>-6</sup> M)</b>
3β-hidroksi-5-androstan-17-on	3,56	2,13 ± 0,07
Pregnenolon	5,70	7,40 ± 0,34

A Rat meme bezi G6PD'si

B : Kobay lensi G6PD'si

Görüldüğü gibi bizim bulduğumuz Ki ler rat meme bezi için bildirilenlerden çok farklıdır. Bunun tür ve doku farkından ileri geldiği kanısındayız. Buna göre G6PD tiplerinin ayrılmasında K<sub>m</sub> değerlerinden başka Ki değerlerinden de yararlanılabilir.

#### KAYNAKLAR

1. Warburg, O. and Christian, W (1931) *Biochem. Z.*, **238**, 131.  
Warburg, O. and Christian, W (1931) *Biochem. Z.*, **242**, 206.
2. Warburg, O. and Christian, W (1932) *Biochem. Z.*, **254**, 438.
3. Negelein, E. and Hass, E (1935) *Biochem. Z.*, **282**, 206.
4. Turchetti, A. (1948) *Riforma Med.*, **62**, 325 - 328.
5. Pauling, L., Itano, H. A., Singer, S. J. and Wells, I. C. (1949) *Science* **110**, 543 - 548.
6. Yoshida, A. (1966) *J. Biol. Chem.* **241**, 4966.
7. Richard W. Geisler, Alyn, Mc. Clure and Robert J. Hansen (1973) *Biochemica et Biophysica Acta*, **327**, 1 - 10.
8. Ammon Hizi and gad Yagl (1974) *European J. of Biochemistry* **45**, 201 - 209.
9. Nevaldine, H., Barbara, Hayde H. Costance and Levy Richard (1974) *Archives of Biochemistry and Biophysics* **165**, 398 - 406.
10. Raineri, R. and Richard Levy, H. (1970) *Biochemistry*, **9**, 11 2233 - 43.
11. Wayne E. Criss and Kenneth W. Mc. Kerns (1968) *Biochemistry*, **7**, 1, 125 - 134.
12. Charlton Josephine M. and Heyningen Ruth van (1971) *Exp. Eye. Res.* **11**, 147 - 160.
13. Zinkham, W. H. and Lenhard, R. E. (1959) *J. Pediat.* **55**, 319.
14. Zinkham, W. H. (1958) *Bull. Hopk. Hosp.* **102**, 169.
15. Peterson, E. A., Sober, H. A. «Methods in Enzymology» (1962) ed. Colowick, S. P., Kaplan N. O., Acedemic Press, Inc., New York, Vol 5, 3.

16. Andrews, P. (1965) *Biochem. J.* **96**, 595.
17. Bonsignore, A., Fornaini, G., Leoncini, G., Fantoni and Segni, P (1966) *Journal of Clinical Investigation* **45**, 12, 1966.
18. Menzel, P., Gobbert, M. and Oertel, G. W. (1970). *Hormone and Metabolic Research* **2**, 225 - 227.
19. Watanabe Akiharu and Taketa Kazuhisa (1972) *J. Biochem.* **72**, 1277 - 1280
20. Benziman Moshe and Mazover A. (1973) *The Journal of Biochemistry* **248**, 5 1603 - 1608.
21. Hockwin, O., Weimar, L., L., Noll, E., Licht, W. (1966) *Albrecht Graefes Clin. Exp. Arch. Ophthalmol.* **170**, 99.
22. Hockwin, O., and Gassner, R. (1968) *Exp. Eye. Res.* **7**, 269.
23. Theorell, H. (1935) *Biochem. Zeits*, **275**, 416.
24. Glaser L. and Brown, D. H. (1955) *J. Biol. Chem.* **216**, 67.
25. Mark, P. A., and Banks, J. (1960). *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **46**, 447.
26. Levy, H. R., (1961) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **6**, 49.
27. Levy, H. R., (1963) *J. Biol. Chem.* **238**, 775.