

TAY-SACHS HASTALIĞINDA HETEROZİGOT KİNETİĞİ

İncilay SİNİCİ¹, H. Asuman ÖZKARA¹

HETEROZYGOTE KINETICS OF TAY-SACHS DISEASE

Summary: Kinetic properties of Hexosaminidase A (Hex A) of heterozygote Tay-Sachs patients were analyzed in this study. Hex A was isolated from leukocyte homogenates using DE 52 ion-exchange chromatography and kinetic analyses of the isolated enzymes were performed. Kinetic analyses revealed similar K_m and V_{max} values to those of control. When the inhibitors NAG and NAGP were used to distinguish two active sites of Hex A, a competitive inhibition with NAG and a slight noncompetitive inhibition by NAGP were observed. At high concentrations of inhibitor NAG, competitive inhibition was found to decrease in heterozygotes which accounts for the saturated less enzyme.

Key Words: Tay-Sachs disease, Hex A, heterozygote kinetics

Özet: Bu çalışmada, Tay-Sachs taşıyıcılarında (heterozigotlarında) Heksozaminidaz A (Hex A) enziminin kinetik özellikleri analiz edildi. DE 52 iyon-değiştirici kolon kromatografisi kullanılarak lökosit homojenatlarından Hex A izole edildi ve izole edilmiş enzimlerde kinetik analiz gerçekleştirildi. Kinetik analizde kontrole benzer K_m ve V_m değerleri tespit edildi. Hex A'nın iki aktif bölgesini birbirinden ayırt etmek için NAG ve NAGP inhibitörleri kullanıldığında, NAG ile kompetitif inhibisyon ve NAGP ile hafif derecede nonkompetitif inhibisyon gözlemlendi. Yüksek NAG inhibitörü derişiminde heterozigotlarda kompetitif inhibisyonun azaldığı bulundu ve bu olay heterozigotlardaki satüre durumdaki düşük enzim miktarına bağlandı.

Anahtar Kelimeler: Tay-Sachs hastalığı, Hex A, heterozigot kinetiği

GİRİŞ

Tay-Sachs hastalığı, GM2 gangliozidozlar içinde en sık görülenidir ve otozomal resesif geçişli hastalıklar için prototip olmuştur. Lizozomal enzim N-acetil-b-heksozaminidaz (Hex) (EC 3.2.1.52) A'nın altbirim geninde tanımlanmış çok sayıda mutasyon enzimin defektif olmasına ve klinik bulguların ortaya çıkmasına neden olmaktadır (1-3). Tay-Sachs hastalığı klinik olarak heterojendir. İnfantil, juvenil ve erişkin tipleri vardır. En erken başlayan infantil tip prognozu en kötü olanıdır. Juvenil ve erişkin tiplerde klinik fenotip rezidüel enzim aktivitesinin düzeyi ile korelasyon gösterir (4,5). İnfantil tipte homozigotlarda enzim tam eksiktir. Heterozigotlarda normalin yarısından daha az seviyededir. Juvenil ve erişkin tipler-

de ise hastalarda normalin %10-25'i aktivite bulunmaktadır. İnfantil tiplerde enzim tam eksik olduğu için kinetik analiz yapılamamakta, juvenil ve erişkin tiplerde kinetik analiz mümkün olabilmektedir.

Tay-Sachs hastalığını eradike etmek amacı ile taşıyıcı tarama programları geliştirilmiştir. Serum ve lökositlerde ısı inaktivasyon esasına dayanan yöntem Hex A'nın analizi için en yaygın olarak kullanılan yöntemdir. Askenazi-Musevilerinde bu sayede 1/29 olan hastalık insidansı 25 yıl içinde %90 azaltılmıştır.

Eksikliğinde Tay-Sachs hastalığı olan Hex A, Hex enziminin bir izoenzimidir. Hex'in 3 adet izoenzimi vardır: Hex A, Hex B ve Hex S. Hex A ab, Hex B bb, Hex S aa altbirimlerinden oluşur ve dimer yapıdadır. Altbirimler ancak dimer oluşturdukları zaman ak-



tiftirler. Dimer yapıdaki enzimin b-altbirimi nötral, suda çözünebilen doğal (glikoprotein, glikolipid) ve sentetik substratları [4-MUG (4-metilumbelliferil-b-D-N-asetilglukozaminid)], a-altbirimi ise buna ek olarak negatif yüklü doğal (GM2 gangliozid) ve sentetik [4-MUGS (4-metilumbelliferil-b-D-N-asetilglukozamin-6-sülfat)] substratları hidroliz edebilir (3-5).

Hex izoenzimleri molekül ağırlıkları, izoelektrik noktaları, taşıdıkları yük ve ısıya dayanıklılık farklılıkları açısından birbirlerinden farklıdır. İzoenzimler bu özelliklerine göre SDS-PAGE, iyon değiştirici kolon kromatografisi, izoelektrik odaklama gibi teknikler ve ısı inaktivasyon yöntemi ile birbirlerinden ayrılabilirler (3-9). İzole edilmiş Hex A ve Hex B'nin sentetik substrat 4-MUG için K_m ve V_m değerleri aynı denecek kadar birbirlerine yakındır. ($K_m = 0.7-0.9$ mM ve $V_m = 10-20$ mmol/saat/mg protein). Hex A'nın negatif yüklü sentetik substrat 4-MUGS için K_m değeri 0.2-0.3 mM iken Hex B'nin K_m değeri yaklaşık bunun 10 katı kadardır. Substratın çözünürlüğünün sınırlı olması nedeniyle tam değeri hesaplanamamaktadır. Hex B MUGS'u hidroliz edebilmekte fakat hidroliz hızı Hex A'nın hızının %1.3'ü düzeyinde kalmaktadır. Hex A'nın katalitik verimi sentetik ve doğal substratlar için çok benzerdir. MUGS için k_{cat}/K_m 800/0.25 103 M iken GM2-aktivatör kompleksi için 1/0.2 106 M'dir (3,10).

Bu çalışmada, enzim ve DNA düzeyinde Tay-Sachs olarak tespit edilen bir homozigot hastanın, enzim ve DNA düzeyinde heterozigot olduğu saptanan ailesinde Hex A izoenziminin kinetik özellikleri analiz edildi.

GEREÇ VE YÖNTEM

Lökosit izolasyonu

Histopaque 1077 ile kan hücreleri dansitelerine göre ayrıldı ve lökosit tabakası alınarak PBS (Phosphate Buffered Saline) ile 2 kez yıkamanın ardından santrifüjle lökositler elde edildi.

Homojenizasyon

Lökosit pelletleri, 3 kez dondurup çözme yöntemi ile homojenize edildi. Mikrofüjde 13000xg'de 1 dk

santrifüjün ardından süpernatantlar ayrılarak 4°C'de saklandı.

Diyaliz

10 mM pH 6 potasyum-fosfat tamponu içinde 0,5cm çapındaki diyaliz membranına 400ml'lik parçalar halinde örnekler konulup 4°C'de 5 saat diyaliz edildi. Diyalizatlar 2000xg'de 10 dk santrifüjün ardından süpernatantları ayrılarak -20°C'de saklandı (6).

İyon değiştirici kolon kromatografisi

1.0'6.5 cm boyutlarında DEAE-selüloz DE 52 kolonu (Whatmann, Maidstone, İngiltere) 10mM pH 6.0 potasyum fosfat tamponu ile dengelendi. Diyalizatlar dengelenmiş kolona uygulandı. Hex A, kolona aynı tamponda 0-0.25M NaCl gradiyenti uygulanarak elde edildi. Fraksiyon kolektörü ile 1 ml'lik fraksiyonlar 60 tüpte toplandı. Fraksiyonların protein içerikleri 280 nm'de spektrofotometrede verdikleri absorbans ile takip edildi (6,11,12).

Enzim Aktivitesi ve Protein Miktarı Ölçümleri

Diyalizatlarda ve fraksiyonlarda Hex aktivitesi substrat 4-MUG (Sigma, USA) kullanılarak fluorometrede ölçüldü (13,14). Protein miktarı tayininde Lowry ve arkadaşlarının önerdiği yöntem kullanıldı.(15).

Kinetik Analiz

Hex enzimine özgül nötral inhibitör N-asetilglukozamin (NAG) (Sigma, ABD) 2.5mM, 5mM, 7.5mM olacak şekilde, 0.1M pH 4.5 sitrat-fosfat tamponu içinde çözülmüş 0.4mM, 0.8mM, 1.2mM, 1.6mM, 2mM substrat 4-MUG çözeltisi içinde ayrı ayrı hazırlandı. Hex A enzimine özgül negatif yüklü inhibitör N-asetilglukozamin-6-PO4 (NAGP) (Sigma, ABD) 2mM, 3mM olacak şekilde, 0.1 M pH 4.5 sitrat-fosfat tamponu içinde çözülmüş 0.4mM, 0.8mM, 1.2mM, 1.6mM, 2mM substrat 4-MUG çözeltisi içinde ayrı ayrı hazırlandı. Hex aktivitesi yüksek çıkmış fraksiyonlarda, çeşitli konsantrasyonlarda inhibitörlerle hazırlanmış değişik konsantrasyonlardaki substratlar kullanılarak Hex aktivitesi ölçümü yapıldı. Her

inhibitör konsantrasyonu için heterozigot annenin, heterozigot babanın, sağlıklı kardeşin ve kontrolün Lineweaver-Burk grafikleri çizildi. Kinetik sabitler; K_m ve V_m , her inhibitör konsantrasyonu için çizilen Lineweaver-Burk doğrusundan hesaplandı (11).

İstatistik

Kinetik çalışmalardan elde edilen verilerin istatistiksel analizi, grafiklerin çizilmesi ve kinetik sabitlerin hesaplanması microsoft office 97 excell worksheet version 7.0 programında yapıldı.

BULGULAR

DE-52 iyon değiştirici kolona uygulanan lökosit diyalizatlarından Hex A izoenzimi, 0-0.25 M NaCl gradyenti ile tüm örneklerde zirve olarak elde edildi (Şekil 1, 2).

Hex A izoenziminin kinetik özellikleri

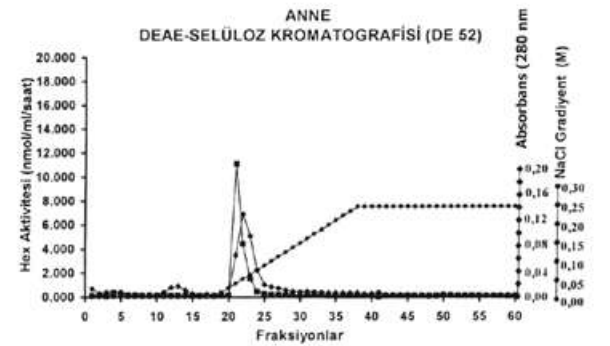
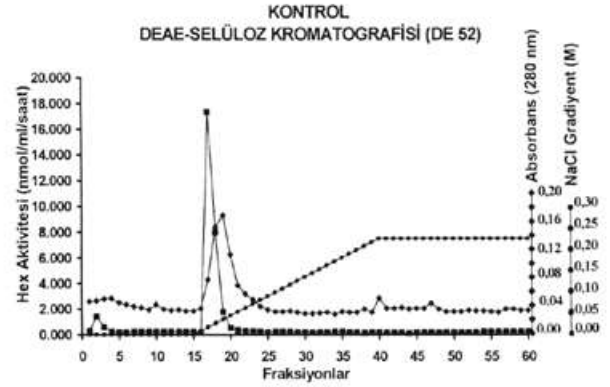
Farklı substrat derişimlerinde artan inhibitör derişimleri kullanılarak Hex A izoenziminin nötral inhibitörü NAG ve negatif yüklü inhibitörü NAGP'nin inhibisyon tipleri saptandı. K_m ve V_m kinetik sabitleri belirlendi. Ortalama K_m değeri 1.125 mM olarak hesaplandı (Tablo 1).

NAG inhibitörünün etkisi

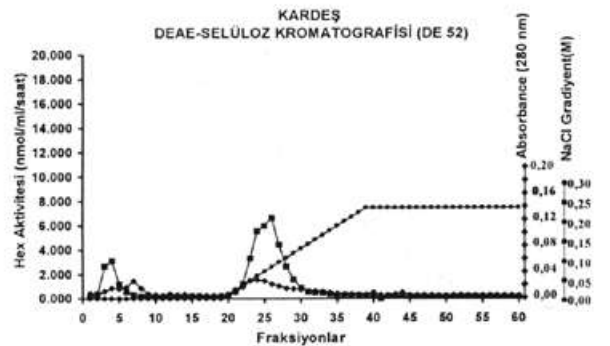
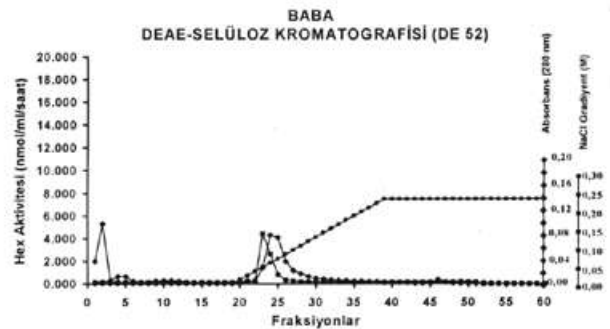
Tüm örneklerde nötral inhibitör NAG ile kompetitif tipte inhibisyon gözlemlendi. Anne ve babanın NAG kullanılarak elde edilen verilerle çizilen Lineweaver-Burk grafiklerinde kontrolden ve kardeşten farklı olarak yüksek inhibitör derişimlerinde (5 ve 7.5 mM) daha fazla bir inhibisyonun olmadığı görüldü (Şekil 3, 4). 5 mM ve 7.5 mM NAG kullanıldığında anne ve babanın K_m değerlerinde kontrol ve kardeşe göre daha az miktarda yükselme olduğu gözlemlendi (Tablo 1).

NAGP inhibitörünün etkisi

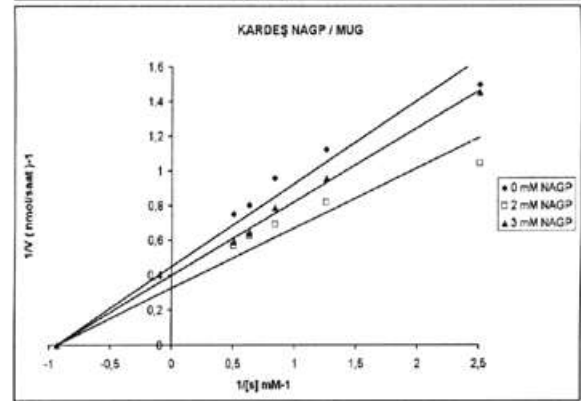
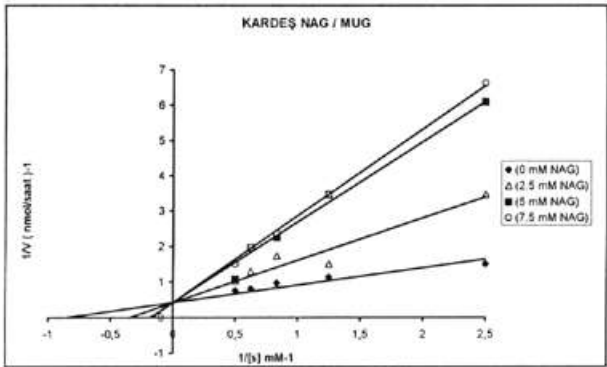
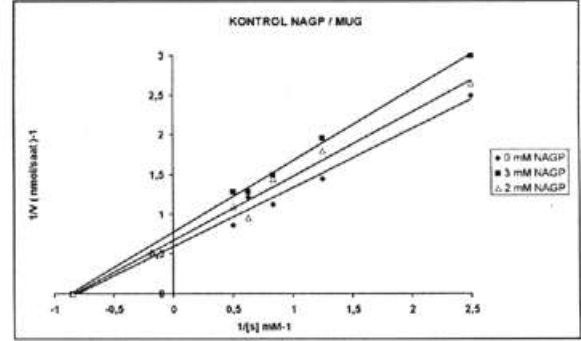
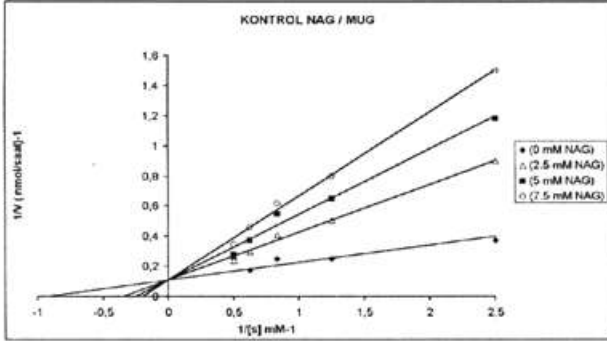
Negatif yüklü inhibitör NAGP ile çok belirgin olmayan nonkompetitif tipte inhibisyon gözlemlendi. Kardeşin, annenin, babanın NAGP kullanılarak elde edilen verilerle çizilen Lineweaver-Burk grafiklerinin kontrole benzer olduğu belirlendi (Şekil 5, 6).



Şekil 1. Tay-Sachs hastalığında heterozigot kine

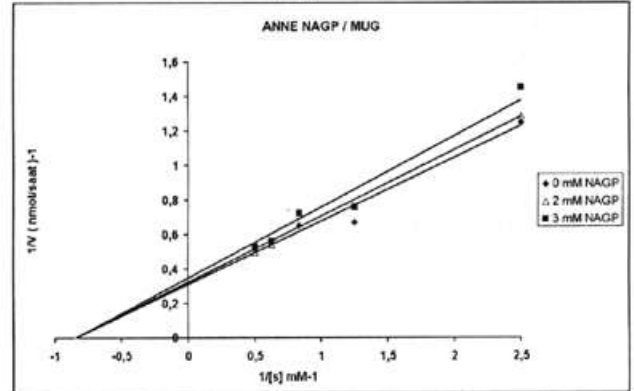
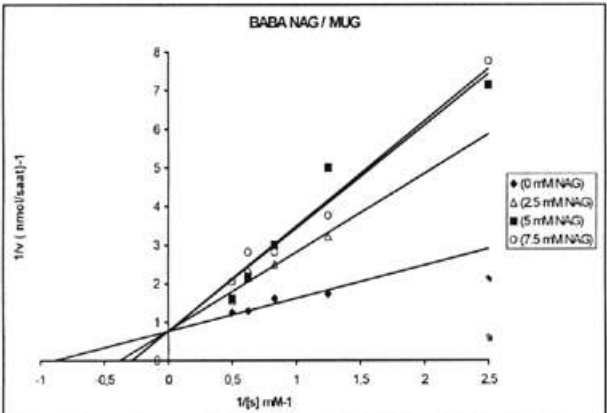
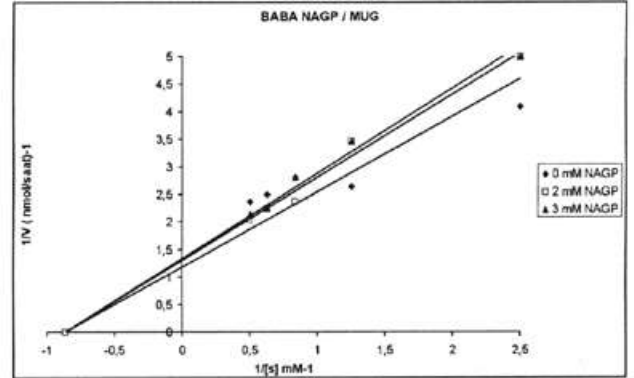
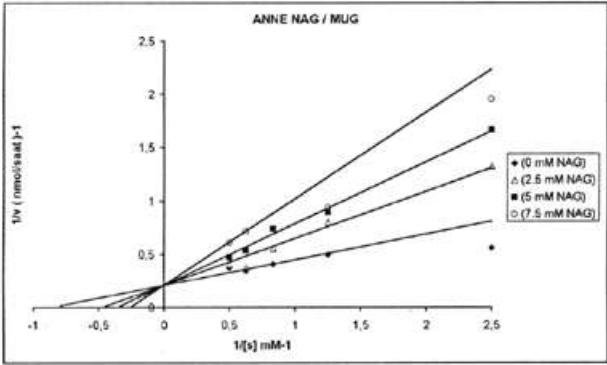


Şekil 2. Tay-sachs hastalığında heterozigot kinetiği



Şekil 3. Tay-Sachs hastalığında heterozigot kinetiği

Şekil 5. Tay-Sachs hastalığında heterozigot kinetiği



Şekil 4. Tay-Sachs hastalığında heterozigot kinetiği

Şekil 6. Tay-Sachs Hastalığında heterozigot kinetiği

Tablo 1. NAG ve NAGP inhibitörlerinin varlığında elde edilen kinetik sabitler

Inhibitörler ve substratlar	KONTROL		KARDEŞ		ANNE		BABA	
	Km	Vm	Km	Vm	Km	Vm	Km	Vm
0mM NAG/ MUG	1.08	1.69	1.19	2.43	1.16	4.78	1.11	1.31
2,5mM NAG/ MUG	2.94	1.69	2.91	2.43	2.11	4.78	2.66	1.31
5mM NAG/ MUG	4.05	1.69	5.52	2.43	2.77	4.78	3.48	1.31
7,5mM NAG/ MUG	5.18	1.69	5.92	2.43	3.88	4.78	3.56	1.31
0mM NAGP/ MUG	1.17	1.69	1.06	3.07	1.18	3.22	1.15	0.84
2mM NAGP/ MUG	1.17	1.29	1.06	2.22	1.18	3.09	1.15	0.77
3mM NAGP/ MUG	1.17	1.46	1.06	2.50	1.18	2.88	1.15	0.75

TARTIŞMA

Şimdiye kadar Tay-Sachs hastalığı için heterozigot olan bireylerde Hex A'nın katalitik ve kinetik özelliklerini belirleyen sayılı çalışma yapılmıştır (3-5,11). Yaptığımız çalışmada, enzim ve DNA düzeyinde Tay-Sachs heterozigotluğu tespit edilen bir ailede Hex A izoenziminin kinetik özelliklerini belirlemeyi amaçladık.

4-MUG ile yapılan kinetik çalışmalarda Hex A için farklı Km değerleri bildirilmiştir: 1.3 mM, 0.91 mM, 0.7 mM, 0.64±0.082 mM (3-5,11). Benzer olarak çalışmamızda sağlıklı bireylerde ortalama Km değeri 1.125 mM olarak tespit edildi. Anne ve babanın Hex A'larının substrat 4-MUG için bulunan Km değerlerinin ortalaması 1.15 mM olarak bulundu. Bu değer literatürde yer alan değerlere ve bizim normal Hex A enzimine sahip olduğumuza bildiğimiz bireylerde bulduğumuz değere oldukça yakın çıkmıştır. Bu sonuç, heterozigot bireylerde Hex A enziminin normal Hex A enzimi ile aynı ilgide 4-MUG'u bağladığını göstermektedir. Enzim miktarının azlığı normal fizyolojik substrat konsantrasyonunda Km'i değiştirmektedir.

Çalışmamızda kullandığımız nötral inhibitör NAG, nötral substrat 4-MUG ile benzer yapıya sahip-

tir. NAG kullanıldığında elde edilen değerlerle çizilen Lineweaver-Burk doğruları kompetitif tipte inhibisyon varlığını göstermiştir. Kompetitif inhibisyonda substrat ve inhibitör aynı bölgeye bağlanmak için birbirleri ile yarışır. Hex A enziminin hem a hem de b-altbirimi aktif merkezi nötral substrat 4-MUG'u bağlar. Nötral inhibitörümüz NAG da her iki aktif bölgeye bağlanarak kompetitif tip inhibisyona yol açmıştır. Anne ve babada yüksek derişimde inhibitör kullanıldığında kontrol ile karşılaştırıldığı zaman inhibisyonun daha az olduğu gözlenmiştir. Km değerleri de yüksek inhibitör derişimlerinde kontrole göre daha küçük bulunmuştur. Bu bulgu, heterozigot olarak tespit ettiğimiz anne ve babanın heterozigotlarda düşük olan Hex A aktivitesi ile açıklanabilir. Kardeşin Km değerleri ve Lineweaver-Burk doğruları kontrole benzer çıkmıştır. Anne ve babadaki Hex A'nın yüksek inhibitör derişimlerinde kontrole göre daha az inhibe olması enzimin miktarındaki azalma sonucu erken saturasyona bağlıdır.

Negatif yüklü inhibitör NAGP nötral substrat 4-MUG ile kullanılmıştır. Farklı substrat derişimlerinde farklı inhibitör derişimleri kullanılarak elde edilen verilerle çizilen Lineweaver-Burk grafikleri az miktarda nonkompetitif tip inhibisyon varlığını göstermiştir. Nonkompetitif tip inhibisyonda inhibitör, katalitik bölgede substratın bağlandığı bölgeden farklı bir yere bağlanarak substratın hidrolizini etkilemektedir. NAGP Km'de değişiklik yapmadığı ve Vm'ı etkilediği için nonkompetitif tip inhibisyon yapmıştır. Negatif yüklü substratların a-altbirimindeki aktif merkeze bağlandığı bilindiğinden NAGP de a-aktif merkez yakınında bir yere bağlanmış ve substrat hidrolizini etkilemiş olmalıdır. Anne ve babada kontrole göre anlamlı farklılık bulunmamıştır.

Hex A aktivitesinde kayba yol açan mutasyonlar akut forma neden olurken, küçük miktarda rezidüel Hex A aktivitesine neden olan mutasyonlar daha ılımlı seyreden ve daha geç ortaya çıkan Tay-Sachs tipine neden olmaktadır. Normal hücrelerde katabolik sistemin hızı, yıkılacak substratların lizozomlara giriş hızından fazladır. Vi'yi yıkılacak substratların bölme-yeye giriş hızı olarak, Vm'i de katabolik sistemin hızı olarak tanımlarsak; normal hücrelerde Vm>Vi'dir. Katabolik hız substratların giriş hızından küçük hale



gelirse geri dönüşümsüz ve giderek artan substrat birikimi meydana gelerek hastalık oluşur, $V_m < V_i$ haline gelir. $V_m = V_i$ olursa tüm enzim molekülleri enzim-substrat kompleksi şeklinde olacaktır. Michaelis-Menten eşitliğine göre, dengedeki substrat konsantrasyonu rezidüel enzim aktivitesinin bir fonksiyonu olarak hesaplanabilir. Normal hücrelerde substrat konsantrasyonu K_m değerinden çok düşüktür. Bu nedenle kalıtsal hastalıkları taşıyan heterozigot bireylerde V_m 'de %50'den %20 değerine kadar azalma hastalık oluşturmamaktadır. Katabolik enzim aktivitesindeki düşüklük, enzimin yüksek substrat saturasyonu ile kompanse edilebilir. Bu kompensasyon mekanizması katabolik hızın substrat giriş hızına eşitleninceye kadar geçerlidir. Bu eşik değerinde tüm enzim molekülleri, enzim-substrat kompleksleri şeklindedir. Rezidüel enzim aktivitesinin eşik değere düşmesine kadar hiç substrat birikimi olmaz. GM2 gangliosidozlu hastaların fibroblast kültürlerinde bu eşik değerinin altında substrat giriş hızının da enzim aktivitesi ile doğrusal olarak azaldığı bulunmuştur. Erişkin tip hastalarda juvenil tip hastalara göre, juvenil tip hastalarda infantil tipe göre daha yüksek katabolik hız bulunmuştur. Bu olay Tay-Sachs hastalarında bulunan rezidüel enzim aktivite değerleri ile semptomların başlama yaşı ve klinik seyir arasında bir ilişkinin olduğunu bize göstermektedir. Infantil tipte GM2 gangliosidin tüm sinir sisteminde daha çok biriktiği gözlenmiştir. Başka bir deyişle homoallelik ve heteroallelik mutasyonlar sonucunda katabolik sistem farklı rezidüel aktiviteler gösterir ve bu hastalığın patogenezi ile ilgilidir. Bu olay genotip ile fenotip arasında bağlantı sağlamakta ve heterozigot bireylerde neden hastalık bulgularının görülmediğini açıklamaktadır (16). Bu çalışmada da yüksek NAG inhibitör derişimlerinde heterozigotlarda izlenen daha az inhibisyon normal allelden gelen normalin yarısı miktardaki enzim miktarı ile ilişkilidir.

Yapılan az sayıda çalışmaya ek olarak bu çalışma Tay-Sachs hastalığının heterozigot kinetiğinin daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunmuştur.

KAYNAKLAR

- Özkara, H.A, Navon, R. (1998) At least six different mutations in HEXA gene cause Tay-Sachs disease among the Turkish population. *Mol Genet Metab.* 65,205-53.
- Özkara, H.A, Akerman, B.R, Ciliv, G, Topçu, M, Renda, Y, Gravel, R.A. (1995). Donor splice site mutation in intron 5 of the HEXA gene in a Turkish infant with Tay-Sachs disease. *Hum Mutat.* 5,186-187.
- Mahuran, D.J. (1999). Biochemical consequences of mutations causing the GM2 gangliosidosis. *BBA.* 1455,105-138.
- Gravel, R.A, Kaback, M.M, Proia, R.L, Sandhoff, K, Suzuki, K, Suzuki, K. (2001). The GM2 Gangliosidosis. The metabolic basis of inherited disease, 8th.edition. New York: Mc Graw Hill Inc. 3827-3877.
- Gravel, R, Clarke, J.T.R, Kaback, M.M, Mahuran, D, Sandhoff, K, Suzuki, K. (1995). The GM2 Gangliosidosis. The metabolic and molecular basis of inherited disease, 7th. edition. New York: Mc Graw Hill Inc. 2839-2879.
- Nakagawa, S, Kumin, S, Nitowsky, H.M. (1977). Human hexosaminidase isozymes: Chromatographic separation as an aid to heterozygote identification. *Clin Chim Acta.* 75,181-191.
- Saifer, A, Perle, G. (1974). Automated determination of serum hexosaminidase A by pH inactivation for detection of Tay-Sachs disease heterozygotes. *Clin Chem.* 20,538-543.
- Kaback, M.M. (1972). Thermal fractionation of serum hexosaminidases: Applications to heterozygote detection and diagnosis of Tay-Sachs disease. *Methods Enzymol.* 28,862-867.
- Benson, P.F, Fensom, A.H. (1985) Genetic biochemical disorders. Oxford University Press, Oxford. 81-149.
- Lang, L, Reitman, M, Tang, J, Roberts, R.M, Kornfeld, S. (1984). Lysosomal enzyme phosphorylation. *J Biol Chem.* 259,14663-14671.
- Peleg, L, Meltzer, F, Karpati, M, Goldman, B. (1995). GM2 Gangliosidosis B1 variant: Biochemical and molecular Characterization of Hexosaminidase A. *Biochem Mol Med.* 54,126-132.
- Peterson, E.A, Sober, H, A. (1962). Column chromatography of proteins: Substituted celluloses. *Methods Enzymol.* 5,3-27.
- Suzuki, K. (1978). Enzymatic diagnosis of sphingolipidoses. *Methods Enzymol.* 50,456-488.
- Suzuki, Y, Berman, P, Suzuki, K. (1971). Detection of Tay-Sachs disease heterozygotes by assay of hexosaminidase A in serum and leukocytes. *J Pediatr.* 78,643-647.
- Lowry, O.H, Rosebrough, N.J, Farr, L, Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193,265.
- Sandhoff, K, Kolter, T. (1997). Biochemistry of glycosphingolipid degradation. *Clin Chim Acta.* 266,51-61.