

KOYUN BEYİNİ GLUTATYON REDÜKTAZININ NADH İLE REAKSİYON MEKANİZMASI

N. Leyla AÇAN, E. Ferhan TEZCAN

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı

ÖZET

Koyun beyni glutatyon redüktazının NADH ile reaksiyon mekanizması incelendi. Enzimin NADH ile olan aktivitesinin aynı şartlarda NADPH ile olanın %1-4'ü olduğu; pH optimumunun 6.8'den 5.2'ye kaydığı; fosfat iyonlarının aktiviteyi arttırdığı görüldü. Aynı şartlarda NADPH ile "ping pong bi bi" mekanizmasını izleyen enzimin, NADH ile olan kinetik davranışının düzenli mekanizmaya uyduğu; 0.1 M sodyum fosfat, pH 6.8 içeren ortamda $K_{m_{NADH}}=1011.0+1.3 \mu M$ ve $K_{i_{NADH}}=207.8+4.2 \mu M$ olduğu bulundu. Bu bulgular glutatyon redüktazın genel davranışının "dalı mekanizma"ya uyduğu görünüşünü desteklemektedir.

Anahtar sözcükler: Glutatyon redüktaz, koyun beyni, NADH, kinetik

SUMMARY

Reaction mechanism of sheep brain glutathione reductase with NADH was investigated. It was observed that the activity of the enzyme with NADH was 1-4% of the activity with NADPH; the pH optimum was shifted from 6.8 to 5.2; and phosphate ions increased the activity. The kinetic behavior of the enzyme with NADH was fitted into "ordered bi bi" mechanism with $K_{m_{NADH}}=1011.0+1.3 \mu M$ and $K_{i_{NADH}}=207.8+4.2 \mu M$ at a medium which contained 0.1 M sodyum phosphate, pH 6.8; the mechanism of the enzyme with NADPH was "ping pong bi bi" at identical conditions. These findings support the hypothesis that the overall behavior of glutathione reductase is "hybrid ping-pong ordered" branched mechanism.

Key words: Glutathione reductase, sheep brain, NADH, kinetics.

Glutatyon redüktaz (GSSGR) [NAD (P) H: okside glutatyon oksidoredüktaz, EC 1.6 4.21 okside glutatyonu (GSSG), redükte nikotinamid adenin dinükleotid (fosfat) [NAD (P) H] kullanarak glutatyonu (GSH) indirgeyen bir flavoenzimdir. Fizyolojik şartlarda reaksiyon tek yönlüdür. Bu şekilde GSSGR hücre içinde GSH/GSSG oranının yüksek tutulmasını sağlayarak hücrenin oksijen radi-

kallerinden korunmasında rol alır (1).

Enzimin doğal substratı NADPH'dır. Çeşitli kaynaklardan elde edilen enzimin, substrat olarak NADPH'yı kullandığı zaman gösterdiği aktivitenin, NADH ile elde edilen aktiviteden 20-100 kat daha fazla olduğu bulunmuştur (2-8).

NADPH'daki 2 fosfat grubu, insan alyuvarı

enziminin aktif merkezindeki adenin cebi olarak adlandırılan bölgede Arg-218, Arg-224 ve His-219'un yan zincirlerine kuvvetle bağlanır. Bu nedenle enzimin NADPH'ya karşı afinitesi 60 kez fazla bulunmuştur (8). NADPH bağımlı flavoenzimlerde NADPH bağlayan bölgenin (GlyXGlyXXA1aXXX Ala XXXXXGly) şeklinde bir "consensus" dizisine sahip olduğu gösterilmiş (9); E.Coli glutatyon redüktazının nükleotid bağlama bölgesindeki amino asitler genetik mühendisliği yolu ile değiştirilerek enzim NADH'yi tercih eder hale getirilmiştir (10).

Daha önceki çalışmamızda koyun beyni GSSGR'sinin NADPH'yi substrat olarak kullandığında, kinetik davranışının dallı mekanizmaya uyduğu gözlenmişti (11). Bu çalışmada ise aynı enzimin NADH ile gösterdiği kinetik davranış incelenmektedir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Gereç: Taze koyun beyinleri Ankara Et ve Balık Kurumu'na ait mezbahadan alındı. Kullanılan bütün kimyasal bileşikler analitik saflıkta idi.

Enzimin Saflaştırılması: GSSGR, daha önce tarif edilen yöntem kısmen değiştirilerek saflaştırıldı (12). Yöntem, %35-55 amonyum sülfat kesiti, 65°C'de bir saat denatürasyonu, 2.5-ADP Sepharose 4B afinite kromatografisi basamaklarını içermekteydi. Afinite kolonundan örnek 0-2 M μ NaCl gradienti uygulanara-

rak elüe edildi. Aktivite gösteren fraksiyonlar birleştirilip, dializ ve konsantre edildikten sonra deneylerde kullanıldı. Bu şekilde saflaştırılan enzim örneğinin spesifik aktivitesi 148 U/mg olup 130 μ g/ml protein içermekteydi.

Enzim Aktivitesinin ölçümü: Saflaştırma sırasında aktivite 0.1 M sodyum fosfat tampunu (pH 6.8) içinde 5mM EDTA, 0.1 mg/ml sıgır serum albumini, 1 mM GSSG, 0.12 mM NADPH ve yeterli miktarda enzim içeren ortamda 37°C'de, NADPH'nin oksitlenmesi 340 nm'de spektrofotometrik olarak izlenerek ölçüldü (12). Bir enzim ünitesi bu şartlarda dakikada 1 mikromol NADPH'yi oksitleyen enzim miktarı olarak tanımlandı.

NADH içeren ortamda pH'nın enzim aktivitesi üzerine olan etkisi araştırılırken değişik pH'larda 0.1 M sodyum fosfat veya sodyum sitrat tamponları ve yukarıdaki aktivite ölçüm ortamından farklı olarak 0.12 mM NADPH yerine 0.12 mM NADH kullanıldı. Bu durumda bir enzim ünitesi, dakikada bir mikromol NADH'yi oksitleyen enzim miktarı olarak tanımlandı.

Substrat olarak NADH kullanıldığında GSSGR'nin kinetik davranışını inceleyebilmek için yapılan deneylerde aktivite ortamı 0.1 M sodyum fosfat tampon, pH 6.8, 5 mM EDTA, 0.1 mg/ml sıgır serum albumini, 0.8 μ g/ml GSSGR ile değişen konsantrasyonlar-

da GSSG ve NADH içermektedir.

NADPH ve NADH konsantrasyonları spektrofotometrik olarak tayin edildi. Kinetik deneylerde LKB Ultraspec Plus, pH-aktivite profili çalışmalarında Beckman Model 25 spektrofotometresi kullanıldı. Protein miktarları Bradford Yöntemi ile ölçüldü (13).

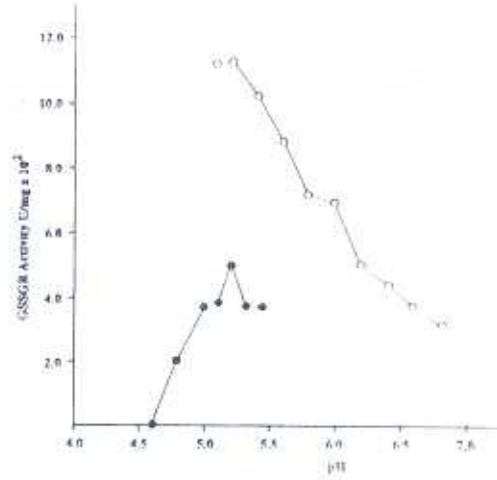
Bulguların analizi için IBM uyumlu kişisel bilgisayarda Systat istatistik paket programının (Systat Inc., Illinois, ABD) "nonlin" modülü kullanıldı.

BULGULAR

GSSGR'nin NADH ile gösterdiği aktivite NADPH'ya göre oldukça düşük bulundu. Spesifik aktivitesi 148 U/mg olan enzim örneğinin aktivitesi standart deney ortamında NADPH yerine aynı konsantrasyonda NADH kullanılarak ölçüldüğünde 6.15 U/mg olarak bulundu. NADPH substrat olarak kullanıldığında 2.73U/mg spesifik aktivite gösteren örneğin spesifik aktivitesi ise yine standart deney şartlarında aynı konsantrasyonda NADH kullanılarak ölçüldüğünde 0.032 U/mg olarak bulundu.

Şekil 1, koyun beyni GSSGR'sinin NADH'yı substrat olarak kullandığı reaksiyon için pH aktivite profilini göstermektedir. Şekilden, NADH substrat olarak kullanıldığında optimum pH'nın 5.2 olduğu görülmektedir. Şekilde görüldüğü gibi fosfat tamponlu ortamda aktivite sodyum sitratlı ortamdakine

göre önemli ölçüde yüksek bulundu.

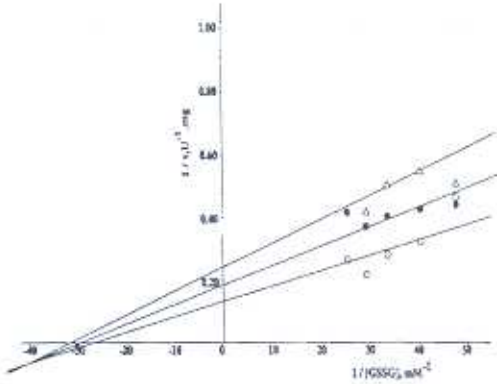


Şekil 1. NADH substrat olarak kullanıldığında koyun beyni GSSGR'si için pH aktivite profili; (o): 0.1 M sodyum fosfat ve (+): 0.1 M sodyum sitrat kullanılarak elde edilen değerler.

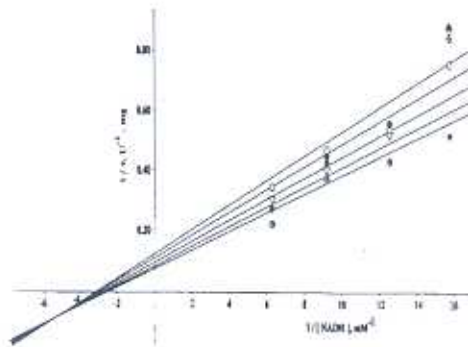
Enzimin reaksiyon mekanizmasını belirlemek için NADH sabit substrat olarak kabul edilip GSSG konsantrasyonu değiştirilerek ve daha sonra GSSG sabit substrat olarak kabul edilip NADH konsantrasyonu değiştirilerek enzim aktivitesi ölçüldü.

Özellikle GSSG konsantrasyonu yükseldikçe kuvvetli bir substrat inhibisyon gözlemlendi ve konkav Lineweaver -Burk eğrileri elde edildi.

Eğri uydurma (curve fitting) yöntemi ile çizilmiş sabit NADH konsantrasyonlarında 1/[GSSG]'ye karşı 1/v grafiği Şekil 2'de ve 1/[NADH]'ya karşı 1/v grafiği Şekil 3'de görülmektedir. Bu yöntemle elde edilen kinetik sabitler Tablo I'de verilmiştir.



Şekil 2. Sabit NADH konsantrasyonlarında Systat paket programı ile tesbit edilen en uygun $1/v-1/[GSSG]$ eğrisi; NADH konsantrasyonları: (Δ): 79.3 μM , (+): 108.2 μM , (o): 156.1 μM .



Şekil 3. Sabit GSSG konsantrasyonlarında Systat paket programı ile tesbit edilen en uygun $1/v-1/[NADH]$ eğrisi; GSSG konsantrasyonları: (o): 20 μM , (•): 25 μM , (Δ): 30 μM , (⊕): 35 μM , (◊): 40 μM .

Tablo I. Koyun beyni glutatyon redüktazı için hız eşitliği ve kinetik sabitler

$$\text{Hız eşitliği: } V = \frac{V_m \cdot [NADH] \cdot [GSSG]}{K_{i,NADH} \cdot K_m,GSSG + K_m,GSSG \cdot [NADH] + K_{i,NADH} \cdot [GSSG] + [NADH] \cdot [GSSG]}$$

Kinetik sabitler:

$$V_m = 56.2 + 1.8 \text{ U/mg}$$

$$K_m,NADH = 1011.0 + 1.3 \mu\text{M}$$

$$K_{i,NADH} = 207.8 + 4.2 \mu\text{M}$$

$$K_m,GSSG = 116.9 + 27.7 \mu\text{M}^*$$

* Kaynak 11'deki değer kullanılmıştır.

TARTIŞMA

Çeşitli kaynaklardan elde edilen GSSGR'nin doğal substratının NADPH olduğu fakat NADH'yi substrat olarak kullanabildiği bilinmektedir (1-8). Sunulan çalışmada, koyun beyni GSSGR'sinin NADH'yi substrat olarak kullandığında, kinetik davranışının hangi "bi bi" mekanizmasına uyduğu araştırılmıştır.

Yapılan ön deneylerde, NADPH ya da NADH kullanılarak, koyun beyni GSSG örneklerinin aktiviteleri ölçüldüğünde, NADH ile elde edilen spesifik aktivitelerin NADPH için bulunan aktivitelerin %1-4'ü kadar olduğu gözlemlendi. Diğer kaynaklardan elde edilen GSSGR örnekleri için de benzer bulgular elde edilmiştir. Örnek olarak insan aljuvar enzimi için bu değer %5 (2), insan lensi

enzimi için %1 (5), *Euglena gracilis* z için %1.3 (6), deniz kestane yumurtasından elde edilen enzim için %1'den azdır (7).

NADH içeren ortamda, pH'nın enzim aktivitesi üzerine olan etkisi incelendiğinde ise (Şekil 1) optimum pH 5.2 olarak saptandı. Buna karşılık NADPH ile elde edilen optimum pH 6.8 idi (14). Benzer şekilde, NADH içeren ortamda, *Euglena gracilis* z'den elde edilen GSSGR için optimum pH, 5.7 (6), deniz kestane yumurtası enzimi için ise 6 (7) olarak bulunmuştur. Substratlara bağlı olarak, optimum pH'larda gözlenen bu farklılık, NADPH'deki adenine bağlı ribozun 2'-fosfat grubuna ait protonun, pH yükseldikçe, disosiyasyon olarak, insan alyuvar enzimi için gösterilen NADPH bağlanma bölgesindeki Arg-218, Arg-224 ve His-219 ile interaksiyona girmesinden kaynaklanabilir (8).

Şekil 1'de görüldüğü gibi, fosfat tamponu içinde enzimin aktivitesinin sitrat tamponuna nazaran önemli ölçüde artması da fosfat anyonunun NADPH bağlanma bölgesindeki arjininler ve histidinle interaksiyona girerek, muhtemelen NADPH'daki 2'-fosfat grubunun görevini kısmen üstlenmesine bağlı olabilir. Staal ve Weeger (3) ile Worthington ve Rosemeyer (4) de yaptıkları çalışmalarında fosfatın enzim aktivitesini artırdığını gözlemişlerdir.

Substrat olarak NADH kullanıldığında, optimum pH'nın 5.2 olarak saptanmasına rag-

men, bulguları daha önce NADPH ile yaptığımız çalışma sonuçları (11) ile karşılaştırabilmek için kinetik deneylerde aktiviteler NADPH ile elde edilen optimum pH'da, yani pH= 6.8'de ölçüldü.

NADH içeren ortamda koyun beyni GSSGR'nin kinetik davranışını bulabilmek için yapılan deneyler sonunda, daha önceki çalışmamızda saptadığımız GSSG inhibisyonunu (11) bağlı olarak, konkav Lineweaver-Burk eğrileri elde edildi ve eğri uydurma yöntemiyle bu noktalardan geçen en uygun doğrular çizildi. Şekil 2 ve Şekil 3'de görüldüğü gibi eğri uydurma yöntemiyle elde edilen doğrular $1/v$, $1/[GSSG]$ ya da $1/[NADH]$ eksenleri üzerinde değil, bunların dışında birer noktada kesismektedirler. Bu da enzimin kinetik davranışının düzenli mekanizmaya uyabileceğine işaret eder (15). Deneysel bulguların en iyi uydugu hız eşitliğini saptayabilmek için en küçük kareler yöntemi ile nonlinear regresyon analizi yapıldı. Mannervik'in (16) prensiplerine göre, kareler toplamı ve standart sapması en düşük olan ve anlamlı parametreler elde edilen düzenli (ordered bi bi) mekanizmasına ait hız eşitliği en uygun reaksiyon mekanizması olarak kabul edildi. Staal ve Weeger (3) ile Worthington ve Rosemeyer (4) de insan alyuvar enzimi için düzenli mekanizmayı önermişlerdir.

Daha önceki çalışmamızda enzimin NADPH'yi substrat olarak kullandığında "ping pong

bi bi" mekanizmasına, NADP⁺'nin ürün inhibisyonu incelendiğinde ise düzenli mekanizmaya "ordered bi bi" uyduğu gözlenerek koyun beyni glutatyon redüktazının kinetik davranışının Mannervik tarafından önerilen (17) dallı reaksiyon mekanizmasına (hybrid ping, pong-ordered) uyduğu ileri sürülmüştü (11). NADPH ile olan reaksiyonun ping pong, NADH ile olanın ise düzenli mekanizmayı izlemesi de bu görüşü desteklemektedir.

Düzenli mekanizmaya ait hız eşitliğinden yararlanılarak ve NADH bağlanmasının enzimin GSSG'ye olan afinitesini değiştirmedeği varsayılarak (GSSG için Km değeri olarak daha önceki çalışmada bulunan 116.9 µM

kullanılmıştır), NADH'nin enzimle yaptığı kompleks için dissosiyasyon sabiti olan $K_{i_{NADH}}=207.8 \mu M$ ve enzimin NADH'ya olan afinitesini gösteren $K_{m_{NADH}}=1011 \mu M$ olarak saptandı (Tablo 1). Daha önceki çalışmada ise $K_{m_{NADPH}}=60.9 \mu M$ olarak bulunmuştu. Km değerleri karşılaştırıldığında enzimin NADH'ya olan afinitesinin, NADPH'ya olandan düşük olduğu görülür. Diğer kaynaklardan elde edilen enzim örneklerinden insan lensi GSSGR'si için $K_{m_{NADH}}=740-800 \mu M$ (5), insan alyuvar enzimi için ise $K_{m_{NADH}}=670 \mu M$ (4) olarak saptanmıştır. Bu nedenle aynı enzim örneği için, aynı şartlarda elde edilen spesifik aktiviteler farklı ve NADH için çok daha düşük olmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Schirmer RH, Krauth-Siegel RL, Schulz GE. Glutathione reductase. In: Dolphin D, Poulson R, Avramovic O, ed. Glutathione: Chemical, Biochemical and Medical Aspects, Part A. New York: John Wiley and Sons, 1989; 553-96.
2. Icen A, Glutathione reductase of human erythrocytes, purification and properties. Scand J Clin Lab Invest 1967; 96: 1-67.
3. Staal GEJ, Veeger C, The reaction mechanism of glutathione reductase from human erythrocytes. Biochim Biophys Acta 1969; 185: 49-62.
4. Worthington DJ, Rosemeyer MA. Glutathione reductase from human erythrocytes, catalytic properties and aggregation. Eur J Biochem 1976; 67: 231-8.
5. Latta K, Augusteyn RC. The purification and properties of human lens glutathione reductase. Exp Eye Res 1984; 39: 343-54.
6. Shigeoka S, Onishi T, Nakano Y, Kitaoka S. Characterization and physiological function of glutathione reductase in *Euglena gracilis*. Biochem J 1987; 242: 511-5.
7. II I, Sakai H. Glutathione reductase in the sea urchin egg. Biochim Biophys Acta 1974; 185: 49-62.
8. Pai EF, Karplus PA, Schulz GE. Crystallographic analysis of the binding of NADPH, NADPH fragments, and NADPH analogues to glutathione reductase. Biochemistry 1988; 27: 4465 -75.

9. Hanukoğlu I, Gutfinger T. cDNA sequence of adrenodoxin reductase; identification of NADP-binding sites in oxidoreductases. *Eur J Biochem* 1989; 180: 479-84.
10. Perham RN, Scrutton NS, Berry A. New enzymes for old; redesigning the coenzyme and substrate specificities of glutathione reductase. *BioEssays* 1991; 13: 515-25.
11. Acan NL, Tezcan EF. Kinetic properties of sheep brain glutathione reductase. *Enzyme* 1991; 45: 121-4.
12. Acan NL, Tezcan EF. Sheep brain glutathione reductase: purification and general properties. *FEBS Lett* 1989; 250: 72-4.
13. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 1976; 96: 595-605.
14. Acan NL. Koyun beyni glutatyon redükta-zının saflaştırılması ve bazı özelliklerinin incelenmesi, Doktora Tezi. H.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1990.
15. Segel IH. *Enzyme Kinetics*. Toronto: John Wiley and Sons, 1975; 560-5.
16. Mannervik B. Regression analysis, experimental error, and statistical criteria in the design and analysis of experiments for discrimination between rival kinetic models. *Methods Enzymol* 1982; 87: 370-90.
17. Mannervik B. A branching reaction mechanism of glutathione reductase. *Biochem Biophys Res Commun* 1973; 53: 1151-8.