

## GLUKOZ-6-FOSFAT DEHİDROGENAZ ENZİMİNİN SIĞIR ERİTOSİTLERİNDEN SAFLAŞTIRILMASI

Dr. Turhan SOYSAL (x)  
Kimy. Orhan DEĞER (xx)  
Ecz. Vedat AKIN (xxx)

### ÖZET:

*DEAE-sellüloz ve CM-Sephadex C-50 kromatografisi kullanılarak glukoz-6 fosfat dehidrogenaz enzimi siğır eritrositlerinden saflaştırıldı. Spesifik aktivitesi 130 U/mg protein olarak belirlenen enzimin elde edilen saflığı 43900 idi. Enzimin saflık kontrolü sellüloz asetat elektroforezi ile, molekül ağırlığı tayini ise Saphadex G-200 ile yapıldı. Ayrıca enzimin kinetik özellikleri araştırıldı.*

### GİRİŞ:

Glukoz-6-fosfat dehidrog enaz (G6PD; D-glukoz-6-fosfat, NADP<sup>+</sup> oksido-reduktaz, E.C. 1.1.1.49) enzimi, heksoz monofosfat (HMP) metabolik yolunun ilk kademedeki reaksiyonunu katalizler, hücrede glukozun oksidatif yıkımının gerçekleştirildiği HMP metabolik yolunda pentoz fosfatlar (nükleik asit sentezinde kull anılırlar) ve redükte glutatyon (GSH; hücreyi oksidan maddelere karşı korur) sentezlenir (1-7). Önemli olan bu metabolik yolun kontrolü allosterekbir enzim olan G6PD tarafından gerçekleştirilir. (2,3), Bu kontrol eritrositler için son derece önemlidir (8). Eritrositler devamlı olarak antioksidan bir pot ansiyele ihtiyaç duyarlar (9). Bu bakımdan eritrosit G6PD aktivite düzeyleri klinik açıdan oldukça önem taşımaktadır (4,10,11).

Birçok araştırmacı (12-24) G6PD enzimini çeşitli dokulardan saflaştırmışlardır. Bu çalışma ile Türkiye'de ilk defa G6PD enzimi genç siğır eritrositlerinden saflaştırılmış olmaktadır.

---

(x) Atatürk Üniv. Tıp Fak. Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç.Dr.

(xx) Atatürk Üniv. Tıp Fak. Biyokimya Anabilim Dalı Araş. Gör. Bilim Uzmanı.

(xxx) Biyokimya Uzmanı, Erzurum.

## MATERYAL ve METOD

Sodyum klorür, potasyum klorür, magnezyum klorür, etilendiamintetraasetik asit (EDTA), tris tamponu, amonyum sülfat, Fisher; 2-merkaptotanol (2-ME) Eastman; 6-fosfoglukonat (6-PG) Serva; glukoz-6-fosfat, nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADP), sığır serum albümini, DEAE-selüloz, Sephadex-G-200, CM-Sephadex, Sigma; üreaz, asetik asit, sodyum fosfat monobazik, sodyum fosfat dibazik, Merck firmalarından temin edildi.

Erzurum Et ve Balık Kurumu Kombinasyonundan temin edilen 35 litre kadar kan 5.25 litre ACD-A (asit sitrat dekstroza-A, antikoagulan) çözeltisi üzerine alınarak (25) sıcaklığı 0-4°C arasında tutulan soğuk bir odaya alındı. Bundan sonraki bütün deneyler burada yapıldı. Kan, 30 ml lik tüplere taksim edildikten sonra 4000xg de santrifüj edildi. Elde edilen eritrosit paketi, izotonik çözelti ile (0.15 M KCl, 1 mM EDTA) üç defa yıkandı. Bu saf eritrositler üzerine litresinde 30 ml toluen (zarların lipidlerinin çözülmesi ve böylece hemolizin sağlanması için) ve % 0.1 oranında 2-merkaptotanol (SH gruplarını korumak için) bulunan çözeltiden 1/1 oranında eklendi. Hücrelerin parçalanmasını temin etmek için 5 dakika süreyle hızlıca çalkalandı. Santrifüj (4800xg) edildikten sonra hemolizatta spektrofotometrik olarak protein (26) ve G6PD aktivitesi (27) tayin edildi. Enzim aktivitesi tayini için biri kör ikisi nümune (T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>) olmak üzere üç tüp hazırlandı. Bu tüplerin her birine sırayla 400 ul tris tamponu (0.15 M, pH 8.0), 100 ul MgCl<sub>2</sub> (0.07 M), 100 ul NADP<sup>+</sup> (deney ortamında 0.2 mM olacak şekilde), 20 ul nümune (1/12 oranında seyreltilmiş olarak) konuldu ve bu tüplere sırasıyla 380, 280 ve 180 ul redistile su ilave edildi. Karıştırıldıktan sonra 25°C da 10 dak bekletildi. Sürenin bitiminde T<sub>3</sub>'e 100 ul 6GP, T<sub>2</sub> ve T<sub>3</sub>'ün herbirine 100 ul 6-PG ilave edildi (6GP ve 6-PG nin deney ortamındaki konsantrasyonu 0.7 mM olacak şekilde ayarlandı). hemen karıştırıldı ve kronometreye basıldı, Kör tüpüne karşı nümune tüplerinin 340 nm deki optik dansiteleri (OD) 15 dak süreyle 1 dak aralıklarla okundu. OD lerin lineer olduğu aralıkta  $\Delta OD/\Delta t$  değerleri hesaplandı. Bulunan değerler aşağıda verilen formüllerde yerine koyularak çeşitli birimlerde aktivite hesaplandı.

$$U/ml = \left[ T_3 \left( \frac{\Delta OD}{\Delta t} \right) - T_2 \left( \frac{\Delta OD}{\Delta t} \right) \right] \cdot \frac{1}{6.22} \cdot \frac{1}{v} \cdot f$$

$$U/100 ml = (U/ml) 100, \quad U/V ml = (U/ml) V$$

Bu formüllerde v, kullanılan nümune hacmi; f, seyreltme katsayısı; V, saflaştırılan materyalin toplam hacmidir.

Hazırlanan DEAE-selüloz kolonu (4x60 cm), tampon-1 (5 mM fosfat, 10 uM NADP, % 0.1 2-ME, 1.0 mM  $\epsilon$  aminokaproik asit ( $\epsilon$ -ACA; pH 6.5) ile doyurulduktan sonra, daha önce hazırlanan hemolizat bu kolondan geçirildi. Daha sonra kolon tamon-2 (5 mM fosfat, 10 uM NADP, 1 mM EDTA, 2 mM  $\epsilon$ -ACA, 0.5 M NaCl, pH 5.8) ile yıkanarak 5 ml lik fraksiyonlar halinde fraksiyon toplayıcıda

elüe edildi (24 ml/saat). Bu elüatlarda protein tayin edildikten sonra G6PD aktivitesi gösteren tüpler birleştirildi. Elde edilen bu aktif çözelti 20 misli hacim tampon-2 ye karşı 7 saat süreyle diyaliz edildi. İşlem üç defa tekrarlandı ve nümune santrifüj (20000xg, 30 dak) edildi. Bu seupernatana 0.5 M asetik asit eklenerek pH sı 5.8 e ayarlandı ve CM-Sephadex C-50 katyon değıştirici kolonuna (4x60 cm) tatbik edildi. Protein çıkışı bitinceye kadar tampon-2 ile yıkandı. Daha sonra tampon-3 (50 mM fosfat, 0.3 M NaCl, 10 uM NADP, % 0.1 2-ME; 1 mM EDTA, pH 7.0) kolona tatbik edilerek bağı olan enzim elüe edildi, aktif fraksiyonlar toplandı.

Elde edilen enzim çözeltisi, Grean (28) metoduna göre önce % 30 luk tuz (amonyum sülfat) çöktürmesine ve sonra % 50 lik tuz çöktürmesine tabi tutuldu. Böylece enzimin çökeltide kalması sağlandı. Çökelti mümkün olan en az hacimde tampon-4 (50 mM fosfat, 1 mM EDTA, % 1 2-ME, 10 uM NADP, PH 6.0) kullanılarak çözüldü. Santrifüj (20000xg, 30 dak) edildikten sonra yukarıda belirtildiğı gibi üç defa dializ edildi. Diyalizat 4800xg de 30 dak santrifüjlenerek yukarıda anlatılan methodla CM-Sephadex kromatografisine tabi tutuldu ve tampon-3 ile elüatlar elde edildi. Aktivite ihtiva eden tüpler bireştirildi. Nümune tampon-5 (1 mM EDTA, 10 uM NADP, pH 6.0) ile diyaliz edildi. Elde edilen diyalizat vakumlu evaporatörde 6 ml kalıncaya kadar buharlaştırıldı ve Sephadex G-200 kolonuyla jel filtrasyonuna tabi tutuldu. Tampon-5 ile tekrar diyalizlendi. Diyalizatlar evaporatörde 5 ml kalıncaya kadar deriştirildi. Bu derişim üzerine litresinde 600 gr amonyum sülfat bulunan tampon-5 den damla damla ilave edildi. Meydana gelen çökelti tekrar diyalizlendi. Diyalizat saflaştırılmış G6PD enzimini ihtiva etmektedir. Her saflaştırma kademesinden sonra protein, total G6PD aktivitesi, total 6-PGD aktivitesi ve spesefik aktivite tayinleri yapıldı.

Sephadex G-200 jel elemesi ile enzim proteinlerinin molekül ağırlığı, alt birim sayısı ve bunların molekül ağırlıkları tayin edildi (29.30.31). Molekül ağırlığı tayininde kullanılan standart eğri, molekül ağırlıkları bilinen üreaz (480000, Merck) alkalen fosfataz (80000, Sigma), sığır serum albümini (67000, Sigma), glukoz oksidaz (154000, BDH) ve peroksidaz (44000, BDH) ile hazırlandı. Enzimin saflığını kontrol etmek amacıyla en son elde edilen enzim çözeltisi deriştirilerek selüloz asetat elektroforezi uygulandı ve sonuçta tek bir band elde edildi. Ezimin kinetik parametreleri konusunda enzim-substrat (G6P), Enzim-koenzim (NADP) ilişkisi, aktivatör ( $Mg^{2+}$ ) ve pH nın aktiviteye etkisi incelendi.

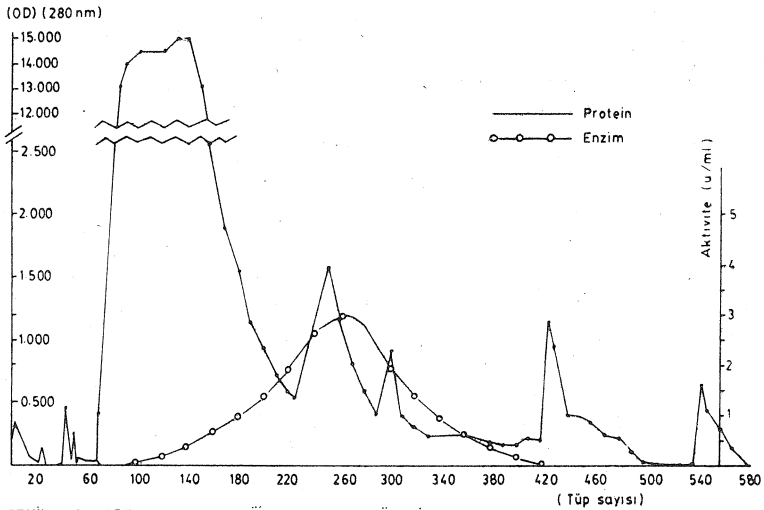
## BULGULAR VE TARTIŞMA

Enzimin saflaştırılması ile ilgili bulgular ve izlenen kademeler Tablo-I'de toplu olarak verildi. Aldığımız 35 litre kandan % 24 verimle enzim saflaştırıldı. Saflaştırma katsayısı 43900 ve özgül aktivite 130 U/mg protein olarak bulundu. DEAE-selüloz ve CM-Sepdadex C-50 kromatografilerine ait eğriler sırasıyla şekil 1 ve 2 de verildi. G6PD nin molekül ağırlığının 210000 ve alt birimlerinininki

ise 52000 olduğu belirlendi. Bu da enzimin dört alt biriminin olduğunu gösterdi. Yapılan kinetik çalışmalar, enzimin pH 8.0 de ve  $6 \times 10^{-3}$ - $12 \times 10^{-3}$  M  $Mg^{+2}$  iyonu konsantrasyonunda maksimum aktiviteye sahip olduğunu gösterdi. Enzimi-substrat ilişkisinden  $K_m = 3.22 \times 10^{-4}$  M ve  $V_m = 641$  umol/dak-mg protein olduğu bulundu (Şekil-3).

| SAFLAŞTIRMA<br>KADEMELERİ                                | TOPLAM<br>HAÇİM<br>(ml) | TOTAL<br>PROTEİN<br>(mg) | TOTAL<br>G-6-PD<br>(ünite) | TOTAL<br>6-PGD<br>(ünite) | G-6-PD'nin<br>spesifik<br>aktivitesi<br>(ünite/mg) |  | SAFLIK | VERİM<br>(%) |
|--|-------------------------|--------------------------|----------------------------|---------------------------|--|--|--------|--------------|
|  |                         |                          |                            |                           | 6-PGD<br>G-6-PD:6-PGD                              | G-6-PD'nin<br>spesifik<br>aktivitesi<br>(ünite/mg) |        |              |
| 2. Kademe: Hemolizat                                     | 24.000                  | $4,55 \times 10^6$       | 12.500                     | 4.100                     | 0,246  | 0,00296  | 1      | 100          |
| 3. Kademe: DEAE Sellüloz kolon elüenti                   | $6 \times 1.700$        | $5,48 \times 10^4$       | 10.375                     | 220                       | 0,021  | 0,19   | 64     | 83           |
| 4. Kademe: CM.Sefadeks kolon elüenti                     | $4 \times 300$          | $3,1 \times 10^3$        | 8.200                      | 20                        | 0,0025   | 2,64   | 891    | 63           |
| 5. Kademe: %30 %50 amonyum Sulfat fraksiyonu             | 100                     | $8,4 \times 10^2$        | 6.750                      | 0                         | 0  | 8,03   | 2.700  | 54           |
| 6. ve 7. Kademe: Diyaliz ve CM-sefadeks elüenti          | 175                     | $1,6 \times 10^2$        | 5.300                      | 0                         | 0  | 33,00  | 11.100 | 42           |
| 8. 9 ve 10. Kademe: Diyaliz ve jel filtrasyonu           | $3 \times 18$           | 28                       | 3.300                      | 0                         | 0  | 117  | 39.500 | 26           |
| 11. Kademe: 260-270gr/l amonyum sulfat dilimi ve diyaliz | 5                       | 23                       | 3.000                      | 0                         | 0  | 130  | 43.900 | 24           |

TABLO 1 G-6 PD ENZİMİNİN SAFLAŞTIRMA KADEMELERİ

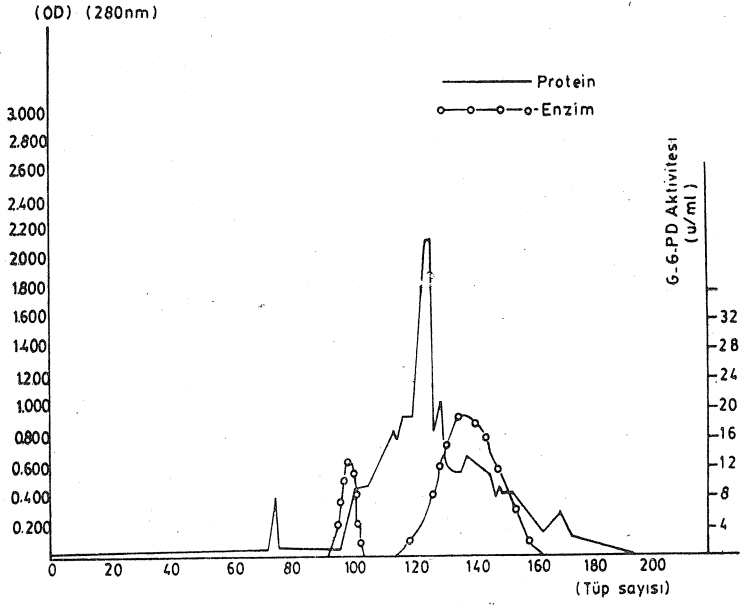


ŞEKİL- 1-3. KADEME: DEAE-SELLÜLOZ KOLONU ELÜENTİ

Kolon boyutu : 4x60 cm Akış hızı : 24 ml/saat

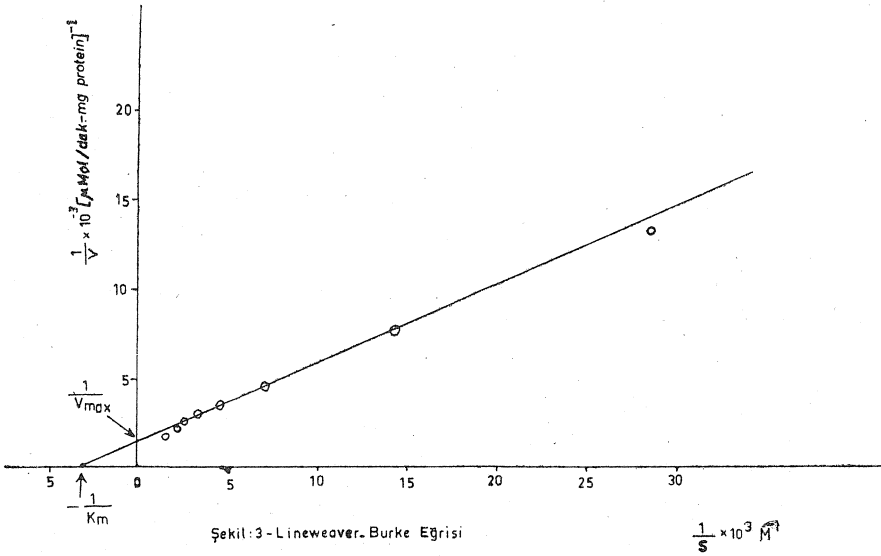
Tambon : Fosfat tamponu (50 mM, pH 7,0)

Fraksiyon hacmi 5 ml



ŞEKİL: 2- 4. KADEME: CM-SEFADEKS KOLONU ELÜENTİ

Kolon boyutu : 4 x 60 cm ; Akış hızı : 24 ml/saat  
 Tampon : Fosfat tamponu (50 mM, pH 5,8)  
 Fraksiyon hacmi 5 ml.



Şekil:3 - Lineweaver-Burke Eğrisi

$$\frac{1}{S} \times 10^3 \text{ M}^{-1}$$

HMP metabolik yolunun ilk reaksiyonunu katalizleyen ve bu yolun düzenlenmesinden sorumlu olan G6PD nin aktivite tayini genellikle 6PGD aktivitesi ile birlikte yapılmaktadır (2,7). Çalışmamızda aynı yöntemi kullandık. Enzimi aktif formda tutmak için deney ortamına belli bir konsantrasyonda NADP<sup>+</sup> eklendi ve aktivite optimum pH da ölçüldü. Saflaştırma kademelerinin tamamında pH nın 7 den düşük tutulmasına dikkat edildi. Çünkü bu pH nın üzerine çıktığı zaman enzim dimer ve tetramer yapısını kaybetmektedir (32). Kısaca bütün saflaştırma basamaklarında düşük pH, düşük fosfat konsantrasyonu ve düşük iyonik şiddet koşullarına dikkat edildi.

## PURIFICATION OF GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE FROM BOVINE ERYTHROCYTES

### SUMMARY

Purification of glucose-6-phosphate dehydrogenase from bovine erythrocytes was carried out by using DEAE-celulose and CM-Sephadex C 50 chromatographies. In order to check the purity of the enzyme, cellulose acetate electrophoresis was applied. Purification was 43900-fold, specific activity was found to be 130 U/mg of protein. Molecular weight was determined by Sephadex G-200 gel filtration. The kinetic parameters of enzyme were investigated.

### KAYNAKLAR

1. Beutler, E.: Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and red cell glutathion peroxidase. *Blood*, 49: 467, 1977.
- 2- Martin, D.W., Mayes, P.A. ve Rodwell, V.W.: *Harper's Review of Physiological Chemistry*, s. 89, Lange Medical Publ., Beirut. 1981.
3. Lehninger, A.L.: *Biochemistry*, s. 443, Worth Publishers Inc., New York., 1975.
4. Kachar, F.J., ve Moss, W.D.: *Enzymes*, Tietz, N. (derleyen), *Fundamentals of Clinical Chemistry*, s. 565, W.B. Saunders, Co., London, 1976.
5. Benziman, M. ve Mazover, A.A.: Nicotinamide adenine dinucleotide and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate specific glucose-6-phosphate dehydrogenase of acetabacter xylinum and their role in the regulation of pentose cycle. *J. Biol. Chem.*, 248: 1603, 1973.
6. Messina, A.M., Chacko, C.M. ve Nadler, H.L.: Glucose-6-phosphate dehydrogenase in the developing human liver. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 139: 778, 1972.
7. Buddecke, E.: *Grundriss der Biochemie*, s 148, Walter de Gruyter, Stuttgart. 1977.

8. Stryer, L.: Biochemistry, s. 543, W.H. Freeman and Co., San Francisco. 1981.
9. Gözükara, E.M.: Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enziminin özellikleri, metabolik ve klinik açıdan önemi. *Biyokimya Dergisi*, 2.: 17. 1978.
10. Aksoy, M.: Hematoloji-I, Eritrosit Hastalıkları, s. 442, Sermet Matbaası, İstanbul.
11. Krupp, M.A. ve Chatton, M.J. (derleyenler): *Current Medical Diagnosis and Treatment*. s. 296. Lange Medical Publ., Beirut, 1981.
12. Warburg, O. ve Christine, V.: Über aktivierung der robisonschen hexose monophosphorsäure in rotenblutzellen und die gel vinung aktivierender fermentlösungen. *Biochem. Z.*, 240: 206. 1931.
13. Moss, R.D.: Glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconic dehydrogenase from *leuconostoc mesenteroides*. Colowick, S.P. ve Kaplan, N.O. (derleyenler), *Methods in Enzymology*, c. I, s. 328, Academic Press Inc., New York, 1955.
14. Viola, R.E.: Kinetic studies of the reactions catalyzed by glucose-6-phosphate dehydrogenase from *leuconostoc mesenteroides*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 228: 415. 1984.
15. Hey, Y.: Tandem dye-ligand chromatography and biospecific elution to the purification of G6PDH from *leuconostoc mesenteroides*. *Biochem. J.*, 209: 363. 1983.
16. Haghigi, B.: Glucose-6-phosphate dehydrogenase from *leuconostoc mesenteroides*. *Biochemistry*, 21: 6415, 1982.
17. Kornberg, A. ve Norecker, B.L.: Glucose-6-phosphate dehydrogenase. Colowick, S.P. ve Kaplan, N.O. (derleyenler), *Methods in Enzymology*, c. I, s. 323, Academic Press Inc., New York) 1955.
18. Julian, G.R., Volter, R.G. ve Rathel, F.J.: Glucose-6-phosphate dehydrogenase from bovine mammary glands, *J. Biol. Chem.* 236: 754. 1961.
19. Noltman, E.A., Guhler, C.J. ve Kuby, S.A.: Glucose-6-phosphate dehydrogenase I, isolation of crystalline enzyme from yeast. *J. Biol. Chem.*, 236: 1225. 1961.
20. Lindholm, H.J.: Rapid chromatographic method for the isolation of G6PDH from yeast enzyme concentrate. *J. Chromatogr.*, 266: 265. 1983.
21. Kirkman, H.N.: Glucose-6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes. *J. Biol. Chem.*, 237: 2346. 1961.
22. Craney, C.L.: A rapid affinity chromatography procedure for the isolation of glucose-6-phosphate dehydrogenase from erythrocytes *Anal. Biochem.* 128: 312, 1983.

23. Chung, A.E. ve Langdon, R.G.: Human erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase I, isolation and properties of the enzyme. *J. Biol. Chem.*, 238: 2309, 1963.
24. Yoshida, A.: Glucose-6-phosphate dehydrogenase of human erythrocytes, I. purification and characterization of normal enzyme. *J. Biol. Chem.*, 241: 4966. 1966.
25. İmren, A.H.: *Klinik Biyokimya*, s. 720, Menteş Matbaası, İstanbul, 1975.
26. Collowick, S.P.: *Methods in Enzymology*, c. III, s. 545. Acad. Press, London. 1975.
27. Bergmeyer, H.U., Bernt, E., Grabl, M. ve Michael, G.: *Ermittlung von Ergebnissen. Bergmeyer, H.U. (ed.), Methoden der Enzymatischen Analyse. c. I, s. 329, Verlag, Chemie, Weinheim, 1974.*
28. Grean, A. ve Hughes, W. L.: Protein purification on the basis of solubility in aqueous solutions of salt and organic solvent. Collowick. S.P. ve Kaplan, N.O. (ed.), *Methods in Enzymology*, C.I, s. 76, Academic Press, London. 1955.
29. Andrews, P.: Estimations of molecular weights of proteins by gel filtration. *Nature*. 196: 36, 1962.
30. Whittaker, J.R.: Determination of molecular weights of proteins by gel filtration on sephadex. *Anal. Chem.* 35: 1950. 1963.
31. Andrews, P.: Estimation of molecular weights of proteins by sephadex gel filtration. *Biochem. J.*, 91: 222. 1964.
32. Cohen, P. ve Rosemeyer, M.A.: Subunit interactions of glucose-6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes. *Eur. J. Biochem.* 8:8, 1969.