

SORBITOL DEHİDROGENAZ

KOYUN KARACİĞERİNDEN KISMİ SAFLAŞTIRILMASI VE BAZI KİNETİK ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ (x)

Dr. Yaşar Nuri ŞAHİN (xx)

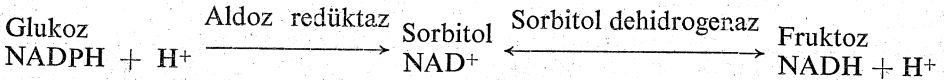
Dr. İsmail Hakkı GÖKHUN (xxx)

ÖZET

Koyun karaciğer sorbitol dehidrogenazı Sephadex G-50 kolon kromatografisi kullanılarak ham homogenata göre % 4,3 verimle 29 kat saflaştırıldı. Kısmen saflaştırılmış enzimin sorbitol, NAD⁺ ve fruktoz substratlarına ilgisi araştırıldı ve bunlar için Michaelis-Menten sabitleri sırası ile 6,9 mM, 0,59 mM ve 96 mM idi. 400 uM dan yukarı konsantrasyonlarda fruktoz substrat inhibisyonuna yol açmaktaydı. Hazırlanan enzimin optimum pH sı sorbitolin yükseltgenmesi yönünde 9,5 ve fruktozun indirgenmesi yönünde ise 7,2 idi.

GİRİŞ

Sorbitol dehidrogenaz (SDH) E.C.1.1.1.14, glukozun fosforillenmeden fruktoza dönüştüğü sorbitol yolu (poliol-yolu) nun iki enziminden biridir. Diğer enzim aldoz redüktaz (AR), (E.C.1.1.1.21) dir. Yolun toplu reaksiyonları aşağıdaki gibidir:



Aldoz redüktazın glukoz için K_M 'i yüksektir. Bu bakımdan fizyolojik glukoz konsantrasyonlarında sorbitol yolu uykudadır. Kân glukozunun yükselmesi ile, glukozun serbestçe hücre içine girdiği dokularda AR faaliyete geçerek glukozu sorbitole dönüştürür. Sorbitol, SDH ile fruktoza dönüşür ve fruktoz üzerinden fruktokinaz ve heksokinaz enzimleri katalizörlüğünde metabolize olur.

(x) Bu çalışma 21-23 Ekim 1987 tarihinde İzmir'de toplanan XIII. Ulusal Biyokimya Kongresinde sunulmuştur.

(xx) Yrd. Doç. Dr., Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi.

(xxx) Doç. Dr., Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi.

SDH, fruktokinaz ve heksokinaz enzimlerinin yetersiz olduğu dokularda hücre içinde sorbitol birikir. Hücre dışına çıkamayan bu molekül hücre içi hipertonsiteye yol açar. Deneyisel çalışmalar diabetik retinopati, nöropati, nefropati atheroskleroz ve kataraktın meydana gelmesinde primer faktörün hücre içi poliol konsantrasyonunun yükselmesi olduğunu ortaya koymuştur (1-4).

Hiperglisemide, insülin den bağımsız olarak glukozun hücre içine girdiği dokular, sorbitol yolunun aktivitesine bağılı olarak oluşturdukları komplikasyonlarla adeta hipergliseminin yükünü çekmektedirler.

Diabetik komplikasyonları azaltma ve önleme açısından kan glukoz konsantrasyonu yanında sorbitol yolu enzimlerinin de kontrol altında tutulması gereği vardır. Bu şüphesiz ki enzimlerin iyi tanınması ile mümkün olabilecektir.

Bu çalışmada, koyun karaciğer sorbitol dehidrogenazı bazı özelliklerini incelemek amacı ile kısmen saflaştırılmıştır.

MATERYAL VE METOD

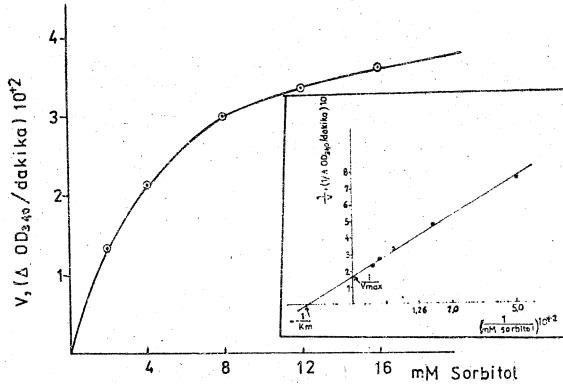
Materyal: Karaciğer, Et Balık Kurumundan kesim anından hemen sonra alınarak serum fizyolojik-buz banyosunda laboratuvara getirilmiştir. (NAD, NADH, Sorbitol, fruktoz, merkoptoetanol, dithiothereitol (DTT) Merck'ten (Batı Almanya) Sephadex G-50 Sigmadan (A.B.D.), moni-Trol Dade'den (A.B.D.) ve diğer kimyasal maddeler Merck'ten emin edildi. Deneylerde Waring blendor; Sorwall SS-1 santrifüjü, LKB, Radi Rac Fraksiyon kollektör ve Beckman Double-Beam model-25 spektrofotometresi kullanıldı.

Metod: protein ölçümleri seyreltik çözeltilerde Lowry (8) ve saflaştırma kademelerinde modifiye Warurg (6) yöntemleriyle Sorbitol dehidrogenaz etkinliği ise Jeffery ve arkadaşlarının spektrofotometrik yöntemiyle ölçüldü (7). Etkinlik ölçüm ortamının bileşiminde, fruktozun redüklenmesi yönünde 1 mM DTT li 20 mM fosfat tamponu (pH 7,4) ilinde 300 mM fruktoz 0,2 mM NADH ile SDH ve sorbitolün yükseltgenmesi yönünde 1 mM DTT li 50 mM Tris-HCL tamponu (pH 8,6) içinde 8 mM sorbitol, 0,4 mM NAD⁺ ile SDH bulunmakta idi. Deneye başlamadan önce reaktifler 25°C deki su banyosunda 20° tutuldu. Reaksiyonlar enzim-koenzim karışımına substrat ilavesi ile başlatıldı ve ilk hız Beckman model 25 spektrofotometrede 340 nm de optik yoğunluk ölçümüyle hesaplandı.

Kısmi Saflaştırma: Mezhabada kesim sonrası alınan taze karaciğer SF-buz karışımı içinde laboratuvara getirildi (x). Zar, bağ dokusu, sinirler ve safra kanalları ayıklandıktan sonra küçük parçalar haline getirilen karaciğer dokusundan 100 g kadarı tartılarak ağırlığının 8 katı hacminde + 4° C ye soğutulmuş 0,02 M tosfat tamponu (pH 7,2) ile blendorda homojenize edildi. Homogenat 3 katlı

(x) Laboratuvardaki saflaştırma işlemleri + 4°C ta yapılmıştır.

bir tül den süz üldü ve süz üntü SS-1 tip sorval santrif üjde 6000 rpm de 10 dakika santrif üj edildi. Süper natant ham homojenat olarak alındı. Ham homojenat yavaş ça karış tırılırken $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ilavesi ile aynı işlemle % 60 doygunluğa getirilip karış tırmaksızın yarım saat dinlenmeye bırakıldı. 6000 rpm de 10 dakika santrif üjlendi ve ç ökelek 0,01 M fosfat tamponu (pH 8,0) ile süspanse edilip alındı. Bu süspanسیونun 1/4 ü daha önce 0,01 M fosfat tamponu (pH 8,0) ile denge lenmiş Sephadex G-50 kolununa (70 x 2,5 cm) verildi ve aynı tamponla 35 ml /saat hızla elue edildi. Elüetlar 5 ml lik fraksiyonlar halinde toplandı. Enzim aktivitesi 135-180 ml lik fraksiyonlarda kolondan çıktı. Enzim aktivitesi 135-180 ml ler arasında idi (Şekil 1). Aktivitenin en yüksek olduğu 145-160 ncı ml ler (29-32 ncı tüpler) birleştirilip kısmi saf SDH preparatı olarak alındı.



Şekil-1 SDH'nin sorbitole ilgisi (Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri). 25° C ta 0,05 M Tris-HCl tamponu pH 8,6 ve 0,4 mM NAD⁺ li deney ortamı.

BULGULAR

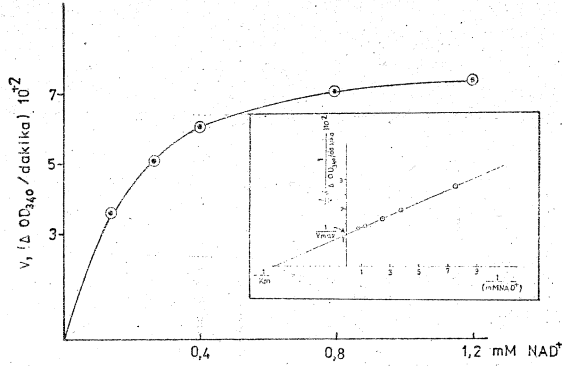
Sephadex G-50 gel filtrasyon ile koyun karaciğ eri SDH'sı ham homogenata göre % 4,3 lük bir verimle 29,41 kat saflaştırıldı. Hazırlanan kısmi saf enzim çöz el-tisinin aktivitesi 148,5 mU/ml ve spesifik aktivitesi 1,59 mU/mg protein idi (Tablo I).

Tablo I: Koyun Karaciğ eri SDH sının Kısmi Saflaştırılması

	SDH protein (mU/ml) (mg/ml)	Spesifik Aktivite (mU/mg)	Toplam Aktivite (mU)	Verim Saflaştırma (%) Oranı
Ham Homogenat	73,35 1350	0,05	52078	100 —
1 ncı $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Fraksiyon	96,41 720	0,13	48205	93 2,47
2 ncı $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Fraksiyonu	135,05 550	0,25	40515	78 4,55
Sephadex G-50 Filtrasyonu	148,5 93,5	1,59	2227	4,3 29,41

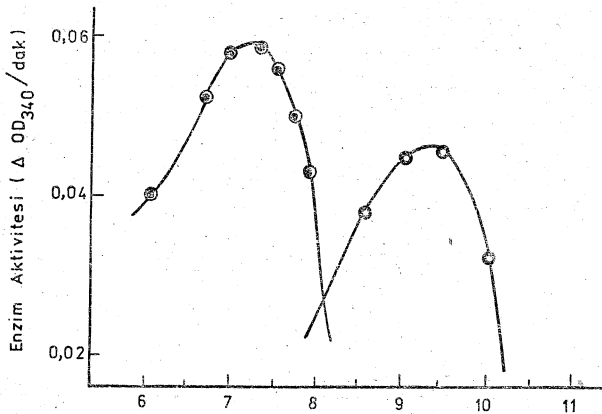
Kısmen saf SDH'nın sorbitol, NAD^+ ve fruktoz için K_M değerleri sırası ile 6,9 mM, 0,19 mM ve 96 mM olarak bulundu (Şekil 1,2,4)

400 mM dan büyük fruktoz konsantrasyonunun inhibisyonu yol açtığı görülmektedir (Şekil 4).



Şekil-2 : SDH'nın NAD^+ ye ilgisi (Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri). 25°C 'ta 0,05 M Tris HCl tamponu pH 8,6 ve 8 mM Sorbitol'ü deney ortamı.

Sorbitolün yükseltgenmesi yönünden optimum pH 9,5 ve ters reaksiyon için optimum pH 7,2 olarak bulundu (Şekil 3).

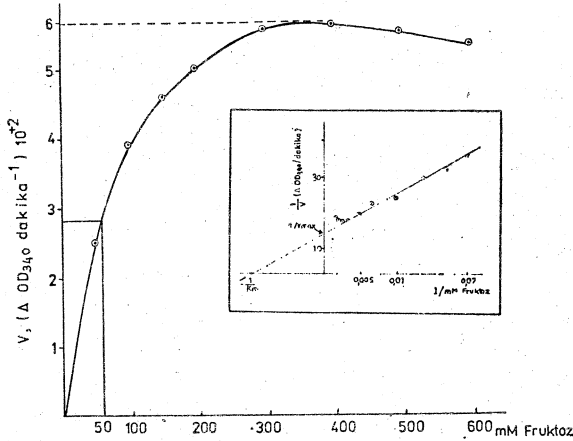


Şekil-3 : pH'nın SDH aktivitesi üzerine etkisi. —●— Fruktozun redüklenmesi yönünde —○— Sorbitolün oksitlenmesi yönünde

TARTIŞMA

SDH, hava oksidasyonuna ve sıcaklıklar çok duyarlı olup' zamanla çok hızlı aktivite kaybeden bir proteindir (7,8). Bu bakımdan saflaştırma işlemleri sırasında protein, 1 mM DTT li ortamlarda ve + 4°C nin altında tutuldu.

Sephadex G-50 filtrasyonundan elde edilen ve ham homogenate göre 29 kat daha saf enzim çözeltisinin substratlara ilgisi, çeşitli tür ve dokulardan farklı metodlarla ileri derecede saflaştırılmış SDH değerlerine uygundu (9,15).



Şekil-4 SDH'nin Fruktaza ilgisi (Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri). 25° C ta 0.02 M fosfat tamponu 7,4 ve 0,2 mM NADH li deney ortamı.

Tesbit ettiğimiz yüksek konsantrasyondaki fruktoz inhibisyonundan insan lens SDH sı ile çalışan Jedziniak (16) ve sıçan karaciğer SDH sı ile çalışan Leissing (11) bahsetmektedirler. Leissing 250 mM dan yukarı fruktoz konsantrasyonunun inhibisyon yaptığını belirtirken Jedziniak konsantrasyon vermemiştir. At karaciğer SDH sı ile çalışan Bailey (17) ise 800 mM konsantrasyona kadar fruktozun inhibisyon yapmadığını bildirmektedir. Christiense SDH'nin "Rapid Equilibrium Random" mekanizması ile çalışmakta olduğunu ve ürün inhibisyonuna uğradığını belirtmektedir (18). Bu mekanizma ile çalışan enzimlerde, substratların bağlama yerlerinin farklı olması ve bağlanma önceliğinin önemli olmayışı nedeni ile substrat inhibisyonu genellikle tarif edilmemektedir.

Alkol dehidrogenaz yapılan çalışmalarda gerek Wratten ve Cleland gerekse Wong ve Hanes hızı sınırlayan kademelerin enzim-koenzim komplekslerinin ayrışması olduğunu bildirmektedirler. Hanes ve arkadaşları etanol veya NADH nin aşırısında E'-NADH-Alc kompleksinin oluştuğunu ve enzimde bir konforon değişikliğinin görüldüğünü rapor etmişlerdir (19). Jörnvall ve arkadaşlarının son yıllardaki çalışmalarında SDH'nin aktif merkez ve koenzim bağlama böl-

gelerindeki amino asit kompozisyonunun memeli ve maya alkol dehidrogenazlarına çok benzediği tesbit edilmiştir (20,25,22). Diğer taraftan Adams ve arkadaşları LDH ile yaptıkları X-ray ve kinetik çalışmalar sonucu NAD nin nikotinamid karbonil grubu ile Lys-250 üzerinden enzime bağlandıktan sonra E-koenzim kompleksinin orientasyonu substratın bağlanıp nikotinamide yakastığını, bu konformasyonel değişme olmadan hidrür iyonunun aktarımının mümkün olamayacağını belirtmişlerdir (19).

Bu bilgilerle uzun zincirli alkol dehidrogenazların bir üyesi olan SDH nın, Hanes ve arkadaşlarının verdiği modele benzer şekilde aşırı fruktoz konsantrasyonunda, konsormasyon değişikliğine uğramış SDH nın SDH-NAD— -Fruktoz kompleksini oluşturmamasından ve dolayısı ile substrat inhibisyonundan bahsetmek mümkün olmaktadır.

SORBITOL DEHYDROGENASE

PARTIAL PURIFICATION AND INVESTIGATION SOME KINETIC PROPERTIES FROM SHEEP LIVER

SUMMARY

Sorbitol dehydrogenase has been partially purified using Sephadex G-50 column chromatography from sheep liver. Purification was 29-fold with a 4.3% yield of crude homogenate. Michaelis-Menten constants of the enzyme preparation have been determined for sorbitol, NAD⁺ and fructose as 6.9 mM, 0.19 mM, and 96 mM, respectively. Fructose, at higher than 4000 mM concentrations, exhibited a substrate inhibition. The optimum pH for sorbitol oxidation was 9.5 and fructose reduction was 7.2.

KAYNAKLAR

- 1- Gabbay, K. (1975): Hyperglycemia, polyol pathway, and complications of Diabetes Mellitus. *Annu. Rev. Med.* 26: 521-536.
- 2- Beyer - Mears, A. (1986): The polyol pathway, sorbinil, and renal dysfunction. *Metabolism*. 35 (4). Suppl: 46-54
- 3- Travis, S.F. (1971): Metabolic alterations in the human erythrocyte produced by increases in glucose concentration. *J. Clin. Invest.* 50: 2014-2112.
- 4- Kinoshita, J.H. (1965): Cataracts in galactosemia. *Invest. Ophthalm.* 4(5): 486-499.
- 5- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.C. Randall, R.J. (1951): protein measurement with the folin-phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.

- 6- Layne, E. (1957): Determination of protein by modified - Warourg U.V. method. s. 447 Clowick, S.P. , Kaplan, N.D. (Derleyenler). *Methods in Enzymology* cilt 3. Academic press, New York.
- 7- Jeffery, J., Cummins, L., Carlquist, M., Jörnvall, H. (1981) : Properties of sorbitol dehydrogenase and characterization of reactive cysteine residue reveal unexpected similarities to alcohol dehydrogenases. *Eur. J. Biochem.* 120: 229-234.
- 8- Bergmayer, H.U., (1974): *Methods of Enzymatic Analysis*, 2. ing. baskı cilt 1-2, s. 36, 170, 512, 872) Academic press. New York.
- 9- Engel, R.E.M.,- Hoskins, D.D., Williams-Ashman, N.G. (1970): Enzymes of nonphosphorylative (Sorbitol) pathway for fructose biosynthesis in primate seminal vesicles. *Invest. Urol.* 7(4): 333-352.
- 10- Goil, M.M., Harpur, R.P. (1977): Aldose reductase and sorbitol dehydrogenase in the muscle of *Ascaris Suum* (Nematoda). *Prasitol.* 77: 97-102.
- 11- Leissing, N., Mc Guinnes, E.T. (1978): Rapid affinity purification and properties of rat liver sorbitol dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta.* 524: 254-261.
- 12- Rehg, J.E., Torack, R.M, (1977) Partial purification and Characterization of sorbitol dehydrogenase from rat brain. *Neurochem.* 28: 655-660.
- 13- King, T.E., Mann , T. (1960) Sorbitol metabolism in spermatozoa. *proc. Royal. Soc. (B).* 151: 226-243.
- 14- Walsall, E.P., Lyons, S.A., Metzger, R.P. (1978): A comparision of selected physicalproperties of hepatic sorbitol dehydrogenases (L-Iditol: NAD Oxi-doreductoses). From fourmammalian species. *Comp. Biochem. Physiol.* 59 (B): 213-218.
- 15- Baretto, O.C., Beutler, E. (1975): The sorbitol oxidizing enzyme of red blood cells. *J. Lab. Clin. Med.* 85 (—): 645-649.
- 16- Jedziniak, J.A., Chylack, L.T., Cheng, H.M., Gillis, M.K., Kalustion, A.A., Tung, W.H. (1985): The Sorbitol pathway in the human lens: aldose reductase and polyol dehydrogenase. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 20(3): 314-325
- 17- Bailey, J.P., Renz, C., Mc Guinness, E.T. (1981): Sorbitol dehydrogenasenase from horse liver: purification, characterization and comparative properties. *Comp. Biochem. Physiol.* 69 B: 909-914.
- 18- Christiensen, U., Tüchsen, E., Andersen, B. (1975): Initial velocity and product inhibition studies on L-Iditol: NAD Oxidoreductase. *Acta. Chem. Scand. B.* 29(1): 81-87.

- 19- Scrimgeour, K.G. (1977): Chemistry and control of enzyme reactions. s. 137-141) 204-218, Academic Press Inc. London.
- 20- Jörnval, H., Carlquist, M., Jeffery, J. (1983): Alcohol and polyol dehydrogenases. Pharmacol. Biochem. Behav. 18 Suppl (1): 67-71.
- 21- Jeffery, J., Caderlund, E., Jörnval, H. (1984): Sorbitol dehydrogenase: The primary structure of the sheep liver. Eur. J. Biochem. 140 (1): 7-16.
- 22- Jörnval, H., Lindstrom, H.B., Jeffery, J. (1984): Extensive variations and basic features in the alcohol dehydrogenase-sorbitol dehydrogenase family. Eur. J. Biochem. 140 (1): 17-23.