

Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz Enzim Eksikliği Saptanan Bir Ailenin Eritrosit Zar Yapısı ile Antioksidan Sistemi

Ar. Gör.Serap YALIN, Ar. Gör. Şule MENZİLETOĞLU YILDIZ, Dr. Kıymet AKSOY

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Balcalı/ ADANA

ÖZET: *Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) enzim eksikliğinde hemolizin oluşmasının eritrositteki enzim aktivitesine ve oksidatif strese bağlı olabileceği düşünülerek eritrosit membran yapısı ve antioksidan sistem birlikte çalışılmıştır. Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimi kısmi eksik olan bir ailenin bireylerinin G6PD enzimi DE-52 selüloz pH 7.0 kolon kromatografisi ile kısmi olarak saflaştırılarak kinetik özellikleri çalışılmış, Dodge metoduna göre eritrosit zar proteinleri incelenmiş, süperoksit dismutaz (SOD) ve malondialdehit (MDA) tayini için Fridovich ve Ohkawa metodları kullanılmıştır. Kısmi saflaştırılmış enzimin kinetik özellikleri ailenin üç bireyinde çalışıldığında Km_{G6PD} değeri her üç bireyde de yüksek bulunurken ($74\mu M$, $156\mu M$ ve $147\mu M$), Km_{NADP} değeri baba ve çocukta yüksek ($9\mu M$, $8\mu M$), annede ise normal bulunmuştur. NAD ve dNADP kullanımı her üç bireyde yüksek, galaktoz kullanımı ise çocukta düşük bulunmuştur. Optimum pH çalışmasında baba ve çocuğun bifazik, annenin ise monofazik özellik gösterdiği gözlenmiştir. Ailenin üç ferdinde band 3 protein eksikliği saptanmıştır. SOD verileri ailenin tüm üyelerinde normal bulunurken plazma MDA düzeyi band 3 eksikliği gözlenen olgularda yüksek bulunmuştur.*

Anahtar Kelimeler: G6PD, eritrosit zar proteinleri, SOD, MDA

GİRİŞ

Pentoz fosfat yolunun (PFY) ilk ve hız kısıtlayıcı anahtar enzimi olan Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD; D-Glukoz-6-fosfat: NADP⁺ oksidoredüktaz, EC 1.1.1.49); bakteri, protozoa, mantar, sinek, balık ve memelileri içeren geniş bir canlı topluluğunda bulunmaktadır. Bu nedenle her yerde hazır ve nazır anlamına gelen “ubiquitous” enzim olarak tanımlanmaktadır. Buna ilaveten üstlendiği biyokimyasal rol nedeniyle yaşam için gerekli olan anlamına gelen “housekeeping” enzim olarak da isimlendirilmektedir. Birçok redüktif biyosentez tepkimelerinin oluşmasında, sülfidril grupların sürekliliğinin sağlanmasında, serbest radikallerin ve peroksitlerin detoksifikasyonunda rol oynayan redükte glutatyonun oluşumunda redükleyici kaynağı görevini üstlenen NADPH, temel olarak PFY’nin ilk enzimi G6PD tarafından Glukoz-6-fosfat’ın (G6P) 6-fosfoglukonolaktat’a (6PG) dönüşümü sırasında oluşmaktadır^{8,9,12,13}.

Dünyadaki en yaygın enzimopati olma özelliğini gösteren G6PD enzim eksikliği hemoglobinopatilerden sonra ikinci sıklıkta görülen kalıtsal bir hastalıktır. Dünya üzerinde 400 milyon kişinin enzim eksikliği taşıdığı saptanmıştır. Böyle bir yaygınlığa sahip enzimin, değişik kinetik özellik gösteren 400’ün üzerinde varyantı olduğu bildirilmektedir. Biyokimyasal özellikleri birbirinden farklı olan bu varyantların moleküler düzeyde çok farklı olmadığı gözlenmiştir^{1,2,17,18,19}.

Enzim geni X kromozomunda yer aldığından G6PD enzim eksikliği X’e bağlı bir geçiş göstermektedir. Bunun sonucu olarak enzim erkeklerde hemizigot, kadınlarda ise heterozigot ya da homozigot olarak ifade edilmektedir¹⁰.

G6PD enzim eksikliği, tüm dokularda bulunmasına rağmen en fazla eksiklik eritrositlerde gözlenmektedir. G6PD enzim aktivitesi, alınan besinlerin yapısı, miktarı, hormonal denge ve

NADP⁺/NADPH oranına bağlı olarak düzenlenmektedir⁴.

G6PD enzim eksikliği gözlenen olgularda redükte glutatyon da azalacağı için serbest radikallerin zarar lipid-protein ilişkisini etkileyeceği düşünülerek bu çalışmada G6PD enzim eksikliği gözlenen bir ailenin eritrosit zar proteinleri ile antioksidan sistemde görev alan süperoksit dismutaz enzim düzeyleri ve lipid peroksidasyonunun son ürünü olan malondialdehit incelenerek serbest radikallerin hemoliz oluşumuna katkısı araştırılmıştır.

MATERYAL ve METOD

Bu çalışmada G6PD enzimi düşük bir olgunun ailesinden (anne, baba, kardeş) 10 ml kan EDTA'lı tüplere alınarak Coulter kan sayacı (Coulter T-890) ile hematolojik verileri saptanmıştır.

G6PD Aktivite Tayini

Eritrositler serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra hemolizat hazırlanmıştır. Bir hacim eritrosit paketi, iki hacim %0.02 digitonin ve iki hacim 20 µM NADP, 1 mM β-merkaptoetanol ve 1 mM EDTA içeren 5mM pH 7.0 sodyum fosfat (NaP) tamponu (tampon A) kullanılarak eritrositler hemoliz edilmiştir. Enzim aktivitesi 0.1 M MgCl₂, 6 mM G6P ve 2 mM NADP içeren 1 M Tris-HCl pH 8.0 tamponu içerisinde ölçülmüştür. Enzim aktivitesi 37°C'de bir dakikada 340 nm'de oluşan 1µ mol NADPH olarak saptanmış, spesifik aktivite ise Ünite/gHb olarak verilmiştir³.

Enzimin DE-52 Selüloz ile Saflaştırılması

2x10 cm çapındaki kolon DE-52 selüloz jeli ile doldurularak kolon pH'sı 7.0 oluncaya kadar tampon A ile yıkanmıştır. Hemolizat kolona tatbik edildikten sonra kolona bağlanmayan proteinler tampon A ile, kolona bağlanan proteinler ise 0.25 M KCl içeren tampon A ile yıkanarak 3ml'lik fraksiyonlar halinde toplanmıştır. Kısmi saflaştırılmış enzim preparatında kinetik parametreler çalışılmıştır^{1,2,4}.

Kinetik Çalışma

20-200 µM G6P ve 40 µM NADP kullanılarak Lineweaver-Burk eğrisi çizilerek Km G6P ve NADP saptanmıştır. 6 mM 2d-G6P, 6 mM Gal-6P, 2 mM NAD ve 2 mM dNADP kullanılarak analogların % kullanımı ve optimum pH saptanmıştır¹.

Eritrosit Zar Proteinleri

Eritrosit zarını hazırlamak için 5ml tam kan kullanılmıştır. Tam kan örneklerinin plazması MDA çalışması ölçümünde kullanılmış, eritrositler ise 310 mOsm'lik fosfat tamponu (pH 7.4) ile yıkanmıştır. Yıkanan eritrositlerden 2ml alınıp üzerine 28 ml 20 mOsm fosfat tamponu eklenip üç defa 11000 rpm'de 40 dakika santrifüj ile hipotonik lizis işlemi gerçekleştirilerek eritrosit zarları hazırlanmıştır. 8 M üre, %2 β-merkaptoetanol ve %2'lik sodyum dodesil sulfat (SDS) karışımı kullanılarak zar (zar proteinleri) çözünür hale getirilmiştir⁵. Bu işlemten sonra zar proteinleri %8.3'lük sodyum dodesil sulfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) yöntemiyle moleküler ağırlıklarına göre ayrıştırılmıştır. Jeller Coomassie Brilliant Blue (%0.5) ile bir gece inkübe edilip boyandıktan sonra boya artıkları asetik asit-metanol-su (5:1:5) karışımıyla temizlenmiştir. Spektrin, ankyrin ve band 3 proteinlerinin miktarı % olarak 545 nm'de dansitometrede (Cliniscan 2) okunmuştur⁶.

Antioksidan Sistem**MDA Ölçümü**

Plazma (100 µl) %8.1'lik SDS, %20'lik asetik asit ve %0.8'lik Tiyobarbitürik asit ile muamele edilip 95°C'de 30 dakika inkübe edildikten sonra soğutulup üzerine 5 ml n-Butanol/Piridin (15/1) çözeltisi eklenerek vorteksleme ile karıştırılmıştır. 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra üstteki organik kısım alınarak spektrofotometrede (Shimadzu UV-260) 532 nm dalga boyunda absorbansı okunmuştur¹¹.

SOD Yöntemi

0.5 ml eritrosit su ile hemoliz edildikten sonra 0.01mM fosfat tamponu (pH 7.0) ile sulandırılarak (1/20) eritrosit lizatı hazırlanmıştır. Eritrosit lizatına (25 µl) Ksantin, 2,4 iyodofenil 3,4 nitrofenol 5-feniltetrazolium klorid (INT) ve 3 sikloheksilamino 1-propan sülfonik asit (CAPS) tamponundan oluşan substrat karışımından (850 µl) eklenip karıştırıldıktan sonra ksantiz oksidaz eklenip, 30 saniye sonra 37°C'de, 505 nm'de havaya karşı başlangıç absorbansı (A₁), 3 dakika sonra ikinci absorbans (A₂) spektrofotometrede (Shimadzu) okunmuştur.

Çalışma körü (25 µl 10 mM fosfat tamponu) SOD içermediği için inhibisyona uğramamış tepkime olarak kabul edilip değeri %100 olarak alınmıştır. Tüm standartlar (850 µl substrat karışımı+125 µl ksantin oksidaz) için % inhibisyon

değeri bunlara ait değerin çalışma körüyle oranlanarak 100'den çıkarılması sonucu hesaplanmıştır⁷.

BULGULAR

G6PD enzim eksikliği saptanan A. ailesinin bütün bireylerinde G6PD enzim aktivitesinin normalden düşük (7 Ü/gHb) olduğu ve Hb elektroforez sonuçlarına göre anne ve oğlunun orak hücre taşıyıcısı, babanın da α talasemi taşıyıcısı olduğu gözlenmiştir (Tablo 1). Aile fertlerinden üç kişinin (anne, baba ve kız çocuğunun) enzim kinetiği çalışıldığında Km_{G6P} değeri her üç bireyde de yüksek (74µM, 156µM ve 147µM) ve annenin Km_{NADP} değerinin normal olduğu gözlenmiştir (Tablo 2). NAD ve dNADP kullanımı her üç bireyde de yüksek, galaktoz kullanımı ise anne ve babada yüksekken, çocukta düşük bulunmuştur. Optimum pH çalışmasında baba ve kız çocuğu bifazik, anne ise monofazik bulunmuştur (Tablo 2). Eritrosit zar proteinleri incelendiğinde anne, baba ve bir çocukta band 3 protein eksikliği saptanırken diğer çocukların normal olduğu gözlenmiştir (Tablo 3, Şekil 1). Bu ailenin antioksidan sistemi çalışıldığında SOD düzeyinin ailenin tüm üyelerinde normal, plazma MDA düzeylerinin anne, baba ve bir çocukta yüksek olduğu saptanmıştır (Tablo 4). Aile α talasemi yönünden incelendiğinde babanın α^{3.7} mutasyonu taşıdığı bulunmuştur (Tablo 1).

Tablo 1. A ailesinin hematolojik verileri

Olgu	Yaş	Hb (g/dl)	RBC (10 ⁶)	MCV (fl)	Hb E	G6PD (Ü/gHb)
A.A(anne)	33	12,5	4,72	85,3	AS	2,6
*S.A.(baba)	32	13,4	5,54	77,9	AA	6,0
G.A.(çocuk)	7	12,0	5,13	76,5	AA	5,0
S.A.(çocuk)	5	12,7	4,74	85,1	AA	1,1
H.A.(çocuk)	8	13,1	5,15	81,4	AS	2,1
Normal sınır	-	K 12-16 E 14-18	K 4,2-5,4 E 4,7-6,1	K 81-99 E 80-94	AA	8-12

*S.A: α^{3.7} mutasyonu taşımaktadır.

Tablo 2. G6PD enziminin kinetik verileri

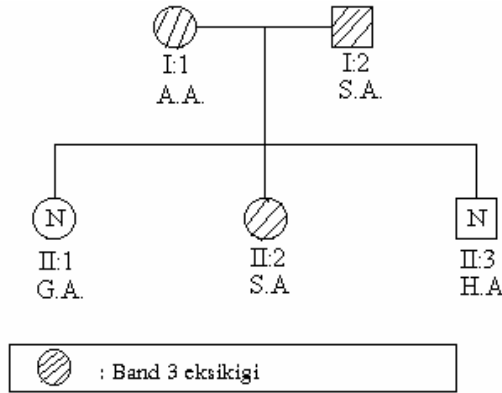
Olgu	Km (μ M) G6P	NADP	Analoz (%) NAD	dNADP	Galaktoz	pH
A.A.	74	2	4,4	98	24	6
S.A.	156	9	6,1	73	82	6,9
G.A.	147	8	7,7	78	4	6,1
Normal sınır	50-70	2-4	1↓	55-60	7-15	8

Tablo 3. Olguların eritrosit membran proteinleri

Olgu	Spektrin (%)	Ankyrin (%)	Band 3 (%)
A.A.	21,7	6,7	16,7 ↓
S.A.	18,1	5,0	16,6 ↓
G.A.	18,2	6,0	19,0
S.A.	20,9	7,1	15,8 ↓
H.A.	20,8	5,2	20,6
Normal sınır	20,7±2,6	4,7±0,9	21,2±2,5

Tablo 4. Antioksidan sistem düzeylerinin karşılaştırılması

Olgu	SOD (Ü/gHb)	MDA (nmol/L)	Band 3 (%)	G6PD (Ü/gHb)	Hb E
A.A.	830	3,3	16,7 ↓	2,6	AS
S.A.	865	5,5	16,6 ↓	6,0	AA
G.A.	840	0	19,0	5,0	AA
S.A.	890	2,9	15,8 ↓	1,1	AA
H.A.	833	0	20,6	2,1	AS
Normal sınır	1030±188	2,2±0,7	21,2±2,5		AA

**Şekil 1. Band 3 eksikliği taşıyan bireyler****TARTIŞMA**

G6PD eksikliğinin dünya üzerinde çok yaygın olarak bulunması, onu üzerinde en çok çalışılan kalıtsal hastalıklardan biri haline getirmiştir. Toplum genetikçilerine, biyokimyacılara ve hücre

biyologlarına yol gösterici olan G6PD enzim eksikliğinin tanısı ve nedeninin araştırılması, biyokimyasal ve de moleküler biyoloji alanındaki teknik ve yöntemlerin gelişmesiyle hız

kazanmıştır^{14,15,16}.

Akdeniz kıyısında yer alan Çukurova'da, enzim eksikliğinin halk sorunu oluşturacak kadar

sık olduğu, enzimin biyokimyasal temelde heterojen bir yapı gösterdiği bilinmektedir^{22,23}.

Bu çalışma sonuçlarına göre G6PD enzim düzeyi ile SOD ve MDA arasında bir korelasyon bulunamamıştır. Aynı şekilde HbS ile SOD ve MDA arasında da bir korelasyon saptanamamıştır; fakat membran proteinlerinden band 3 eksikliği ile MDA arasında ilişki olabileceği düşünülmüştür (Tablo 4). Bu sonucun hemolizin fizyopatolojisi ile ilişkisine bakacak olursak:

Biyolojik zarın majör yapısı lipid ve proteinlerdir²⁰. Protein miktarı, zarın fonksiyonlarının sayısı ile birlikte artar. Malondialdehit lipid peroksidasyonun sekonder bir ürünü olup, lipitlere ait peroksidasyonun belirlenmesinde kullanılan önemli bir parametredir. Lipid peroksidasyonu, poliansatüre lipitlerin oksidatif bozulmasıdır. Poliansatüre yağ asitleri oksidatif hasara uğrarsa zar yapısı ve fonksiyonu hasar görebilir. Lipid peroksidasyonu, lipitler kadar zar proteinlerine de hasar verebilir. Lipid peroksidasyonu sırasında ortaya çıkan MDA ölçülerek lipid peroksidasyonunun miktarı saptanabilmektedir. Böylece lipid peroksidasyonundaki bozukluk, zar yapısını ve dolayısıyla da zar proteinlerini etkileyecektir. En çok etkilenen zar proteini band 3 olacaktır. Band 3 proteini integral ve transmembran bir protein olup aynı zamanda anyon kanalı olarak da adlandırılır²¹. Bu protein hem eritrosit iskelet öğelerinin zara bağlanmasını sağlar, hem de zarın lipid tabakasını boydan boya geçerek kanal görevi görür. Bu şekilde Cl^- ve HCO_3^- gibi anyonların zardan geçişini sağlar. Band 3 proteinindeki bozukluk anyon giriş ve çıkışını etkileyeceğinden hücrenin osmotik basıncı ve buna bağlı olarak da hücre volümü artacak ve bu nedenle de hemoliz gerçekleşecektir. Hemolizin şiddetine bağlı olarak

da MDA düzeyi değişecektir.

SUMMARY

Erythrocyte Membrane Structure and Antioxidant System of a Family with G6PD Enzyme Deficiency

In the G6PD deficiency syndromes the cause of hemolysis is thought to be due to low enzyme activity and oxidative stress in the erythrocytes. To investigate the possible contributions the erythrocyte membrane proteins, antioxidant system and the G6PD enzyme activities of a family, known to be moderately deficient, were analyzed. The enzymes were purified from blood samples by utilizing DE-52 cellulose pH 7.0 column chromatography. Biochemical properties of G6PD were studied in these partially purified enzymes. The erythrocyte membrane proteins were detected according to the Dodge method. The Fridovich and Ohkawa methods were used for the detection of superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyd (MDA). When the biochemical properties of partially purified enzyme were studied, three members of the family found to have high K_m ($74\mu M$, $156\mu M$ and $147\mu M$) for G6PD and also father and his daughter have high K_m $NADP$ ($9\mu M$, and $8\mu M$) values. Utilization of NAD and dNADP analogs was high in three members of the family, utilization of galactose was high in mother and father but low in daughter. At the optimum pH studies, although father and daughter had biphasic pH optimum curve but mother had monophasic pH curves. Abnormality in membrane proteins were detected as band 3 deficiency in three members of family. While the data of SOD were found to be normal in all members of the family, the plasma malondialdehyd values of mother, father and one daughter were measured as high.

Key Words: G6PD, erythrocyte membrane proteins, SOD, MDA.

KAYNAKLAR

1. Aksoy G, Yüregir GT, Dikmen N and et al. Three new G6PD variants, G6PD-Adana, G6PD-Samandağ and G6PD-Balcalı in Çukurova, Turkey. *Hum Genet* 1987; 76:199-201.
2. Aksoy G, Yüregir GT, Dikmen N ve ark. Türkiye'de saptanan yeni bir G6PD- β^+ varyantı: G6PD-Antakya. *Ç Ü Tıp Fak Der* 1990;15:186-198.
3. Beutler E. A Manual of Biochemical Methods, 1975, pp:265-276.
4. Beutler E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase gene deficiency. *N Engl J Med* 1990; 324: 169-173. 1991.
5. Dodge JT, Mitchell C, Hanahan DJ. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. *Arch Biochem Biophys* 1963; 100:119-130.
6. Fairbanks G, Steck TL, Wallach DFH. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* 1971; 10:2606-2616.
7. Fridovich I, Mc Cord JM. Superoxide dismutase. An enzymatic function for Erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969;44:6049-6055.
8. Luzzatto L, Battistuzzi G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Adv Hum Genet* 1985; 14:217-329.
9. Luzzatto L. Glucose-6-phosphate dehydrogenase: Genetic and haematologic aspects. *Cell Biochem Func* 1987; 5:101-107.
10. Martini G, Toniolo D, Vulliamy T, et al. Structural analysis of the X-linked gene encoding human glucose-6-phosphate dehydrogenase. *EMBO J* 1986; 5: 1849-1855.
11. Ohkawa H, Ohishi N, Tagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979;95:351-358.
12. Persico MG, Viglietto G, Martini G, et al. Isolation of human glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) cDNA clones: Primary structure of the protein and 5' non-coding region. *Nucleic Acid Res* 1986; 14:2511-2522.
13. Poggi V, Town M, Foulkes NS, et al. Identification of a single base change in a new mutant glucose-6-phosphate dehydrogenase gene by polymerase chain-reaction amplification of the entire coding region from genomic DNA. *Biochem J* 1990; 271: 157-160.
14. Tang TK, Tam K-B, Huang S-C. High level and erythroid-specific expression of human glucose-6-phosphate dehydrogenase in transgenic mice. *J Biol Chem* 1993; 268: 9522-9525.
15. Ursini MV, Scalera L, Martini G. High levels of transcription driven by a 400 bp segment of the human G6PD promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 170: 1203-1209.
16. Valentine WN, Paglia DE. Erythroenzymopathies and hemolytic anemia: The many faces of inherited variant enzymes. *J Lab Clin Med* 1990;115: 12-20.
17. Viglietto G, Montanaro V, Calabro V, et al. Common glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) variant from the Italian population: Biochemical and molecular characterization. *Ann Hum Genet* 1990; 54: 1-15.
18. Vulliamy TJ, D'Urso M, Battistuzzi G, et al. Diverse point mutations in the human glucose-6-phosphate dehydrogenase gene cause enzyme deficiency and mild or severe hemolytic anemia. *Proc Natl Acad Sci* 1988; 85: 5171-5175.
19. Vulliamy TJ, Mason P, Luzatto L. The molecular basis of glucose-6-phosphate dehydrogenase gene deficiency. *Trends Genet* 1992; 88: 138-143.
20. Yalın S, Aksoy K. Eritrosit membran proteinleri. *ARŞİV* 1998; 7:25-35. 1998.
21. Yalın S, Aksoy K. Eritrosit membran proteinleri bozukluklarının neden olduğu hemolitik anemiler. *ARŞİV* 1998; 7:367-378.
22. Yüregir GT, Aksoy K, Dikmen N, et al. Heterogeneity of G6PD in Çukurova, Turkey. *Biochim Clin* 1989;13:933-935.
23. Yüregir GT, Aksoy K, Arpacı A, et al. Studies on red cell G6PD: Evaluation of reference values. *Ann Clin Biochem* 1994; 31:50-55.

Yazışma Adresi:

Prof.Dr.Kımet AKSOY
Çukurova Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Biyokimya Anabilim Dalı
01330 Balcalı-ADANA