

İNSAN NÖTROFİLİ ÇÖZÜNEBİLİR NADH OKSİDAZ ENZİMİNİN BAZI ÖZELLİKLERİ

Dr. Mustafa ÜNALDI*, Dr. İdris AKKUŞ*, Dr. Mehmet AKÖZ*,

Dr. Mehmet GÜRBİLEK*, Bil. Uzm. Mustafa YÖNTEM**, Dr. Orhan DEĞER***

*S.Ü. Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı

** S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Öğrencisi

*** Karadeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı

ÖZET

Bu çalışmada insan nötrofil granülositlerinden saflaştırılmış NADH oksidaz enziminin bazı özellikleri araştırılmıştır. Sonuçta enzimin molekül ağırlığı 280.000 K_m 'si 4.8×10^{-4} , optimum pH'si 7, optimum sıcaklığı 37 °C olarak tesbit edilmiş, ayrıca ATP, ADP ve steroidler tarafından inhibe edildiği anlaşılmıştır. Saflaştırılmış enzimin NADPH'ı oksitlemediği görülmüş ve NADH'e spesifik olduğu anlaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Nötrofil, NADH oksidaz

GİRİŞ

İnsan ve kobay lökositlerinin alkalın potasyum klorür homojenatlarının süpernatant fraksiyonları siyanide duyarsız NADH oksidaz aktivitesine sahiptirler (1-4). Bu enzim oksijen ve NADH'dan H₂O₂ oluşumunu katalize eden bir flavoproteindir. Enzimin eksikliğinde H₂O₂ üretimi yeterli olmaz ve mikroorganizmalar öldürülemez (1-3,5,6).

Enzim hakkındaki ilk çalışmalar 1957'de başlamış ve artarak devam etmiştir.

Enzim üzerindeki çalışmalar da, meteryal teminindeki zorluklardan dolayı saflaştırılması ve kinetik özelliklerinin araştırılması istenen seviyede yapılamamıştır. Enzime ait farklı K_m değerleri bulunmuş ve substratı hakkında tartışmalar ya-

SUMMARY

Some Properties of Human Neutrophil Soluble NADH Oxidase

In this study, some properties of NADH oxidase, which had been previously purified from human neutrophils, was determined. Molecular weight of the enzyme was found as 280.000, K_m as 4.8×10^{-4} optimum pH 7 and optimum temperature 37 °C. ATP, ADP and steroids were found to inhibit the enzyme.

The enzyme was also found to be specific for NADH and showed no activity for NADPH.

Key Words: Neutrophil, NADH oxidase

pılmıştır.

Bu çalışmalarda, daha önce saflaştırdığımız NADH oksidaz enziminin çeşitli özellikleri araştırılmıştır.

MATERYAL VE METOD

Çalışmamızda kullanılan çeşitli kimyasal maddeler analitik saflıkta olup değişik firmalardan sağlanmıştır.

1) Enzimin Molekül Ağırlığının Tayini:

Nötrofil Granülositlerden saflaştırılan enzimin molekül ağırlığı Andrew'a göre yapıldı (7) Araştırmamızda bovin albumin (M.A. 67.000), ovalbumin (M.A. 43.000), Alkalın fosfataz (M.A. 80.000), Glikoz oksidaz (M.A. 154.000), üreaz

(M.A. 480.000), Peroksidaz (M.A. 44.000), Blue dekstran (M.A. 2 milyon), Ürikaz (M.A. 120.000) ve laktik Dehidrogenaz (M.A. 130.000) kullanıldı. her proteinden 5 mg/ml lik solüsyonlar hazırlanmış (7) ve 4x50 cm'lik sefadeks G-200-120 kolonuna ayrı ayrı uygulanarak pH 7.5'de 500 nm'luk TRIS-HCL asit tamponu ile elüe edildi.

Blue dekstran için 625 nm de, proteinler için ise 280 nm de yapılan tarama ile her birinin yıkama hacimleri tesbit edildi. Elde edilen yıkama hacimleri apsiste molekül ağırlıklarının logaritması ordinatta gösterilerek grafik çizildi. Daha sonra bilinmeyen numunemizin molekül ağırlığı grafikte de-ğlendirilerek bulundu.

2) Sefadeks G-200 ile enzimin alt birimlerinin araştırılması: Yaklaşık 0.1 mg enzim 1 mM EDTA içeren bir ml 6 M guanidin hidroklorür ile karıştırıldı ve 42 °C'de 45 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra numune 0.9x50 cm'lik bir sefadeks G-200 kolonuna uygulanarak jel elemesine tabi tutuldu (8). Yıkama fraksiyonlarından protein ve enzim aktivitesi aranarak alt birim taraması yapıldı.

3) İzoenzim araştırılması:

Saflaştırılmış enzim numunesi ile Jel elekt-roforozi yapıldıktan sonra tüpten çıkarılan jel kolonu tesbit ve boya işlemi yapılmaksızın NADH içeren or-tamda MTT tetrazolium ile enzimatik inkübasyona tabi tutularak enzimin izoenzimlerinin olup olmadığı araştırıldı (9)

4) N-ucu Amino Asitlerinin Tayini:

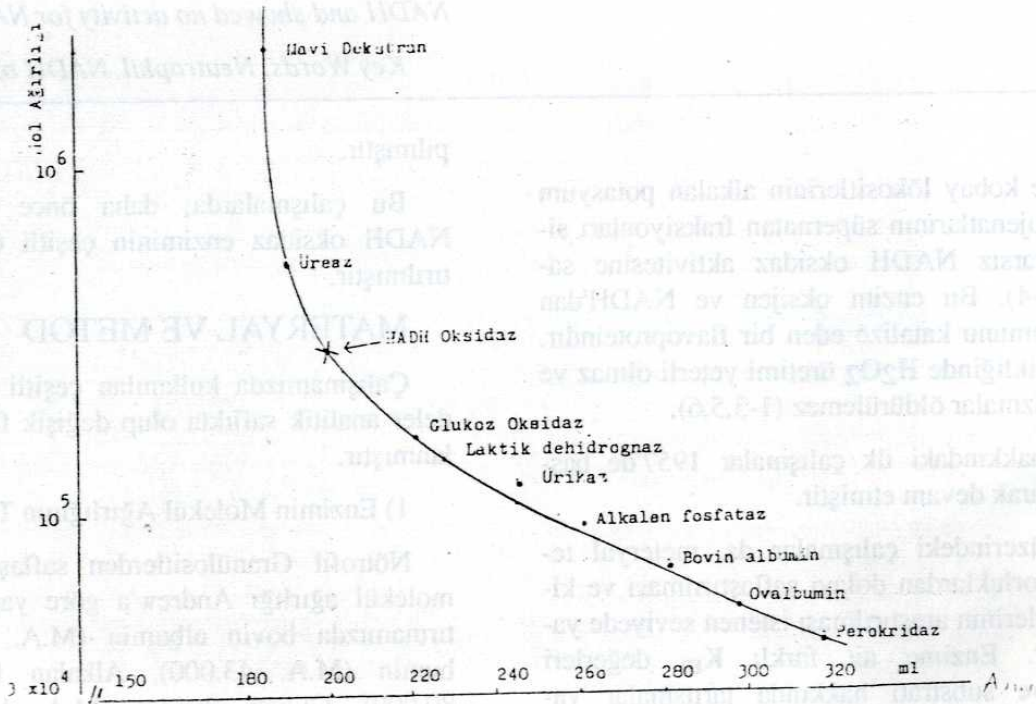
Bunun için Gray'in geliştirdiği dansil klorür me-todu kullanıldı (10-11). İnce tabaka kromatografisi yapıldı.

5) Yukarıda yapılanlara ilaveten enzimin op-timum pH'sı, optimum ısısı, steroidlerin aktiviteye etkisi, Substrat konsantrasyonunun enzimatik re-aksiyona etkisi, ATP ve ADP'nin aktiviteye etkisi ve enzimin substrat spesifikliği ayrı ayrı araştırılarak tesbit edildi.

BULGULAR

Meteryal ve metod bölümünde açıklandığı gibi molekül ağırlığı tayini sefadeks G-200 jel elemesi ile yapılmıştır. Standartlara ait sonuçlar Şekil-1'de gra-fik edilmiştir.

Numunenin molekül ağırlığı Şekil -1'deki gra-



Şekil 1. NADH oksidazın molekül ağırlığının sefadeks G-200 jel elemesi ile bulunması.

fikten değerlendirilmiş ve 280.000 olarak bulunmuştur.

Alt birim araştırılmasında enzimin tek bir alt-biriminden oluştuğu anlaşılmıştır.

İzoenzim tayininde enzimin izoenzimlerinin olmadığı gösterilmiştir.

Enzimin N ucu amino asidinin alanin olduğu tesbit edilmiştir.

Çalışmamızda protein koruyucusu olarak kullanılan 2-Merkaptoetanol (2 ME), ϵ - amino kaproik asit ve toluenin enzim aktivitesine etkisi olmadığı anlaşıldı. Aynı şekilde eklenen ve enzimin koenzimi olan FAD'nin aktiviteye herhangi bir etkisinin bulunmadığı gösterildi.

Artan substrat konsantrasyonlarında elde edilen reaksiyon hızları ile çizilen Michaelis-Menten ve Lineweaver-Burk grafikleri Şekil - 2'de gösterilmiştir. enzimin K_m değeri bu grafiklerden 8×10^{-4} M olarak bulunmuştur.

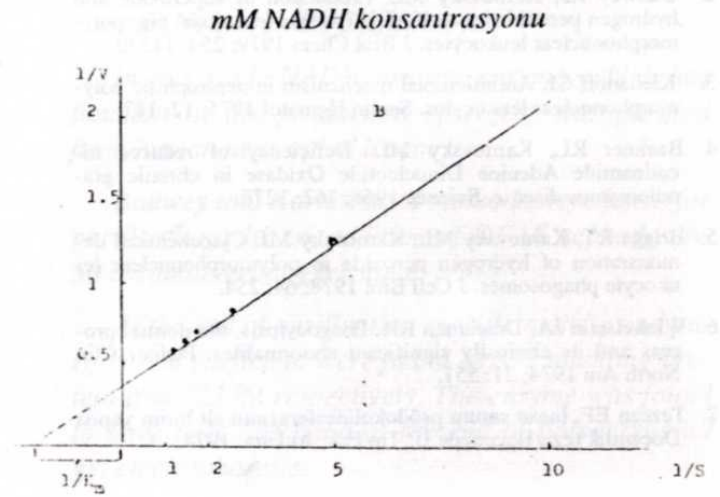
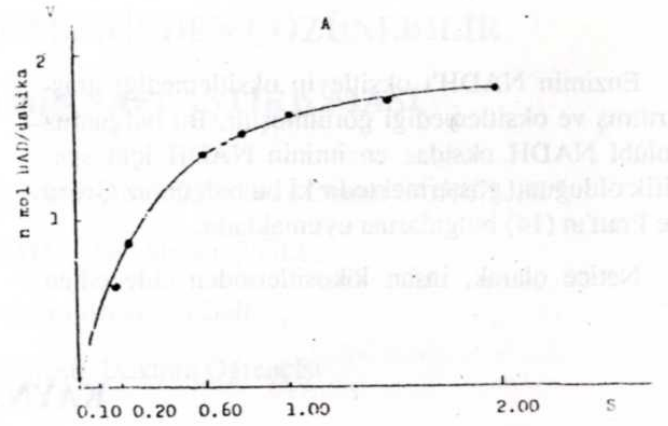
Enzimin optimum pH'sı 7 ve optimum ısı 37 °C olarak bulundu. Ancak enzimin geniş bir pH ve ısı aralığında aktivite gösterdiği anlaşıldı.

Östradiol, androsteron, dezoksikortikosteron, ATP ve ADP'nin enzim aktivitesini inhibe ettikleri görülmüştür. 100 μ m ATP % 82, 100 μ m ADP % 70 inhibisyon göstermektedir. Enzim spesifikliğinin belirlenmesi için NADPH substrat olarak hazırlanıp saflaştırılmış enzim preparatı ile aktivite ölçümü yapılmış ve aktivite bulunamamıştır.

TARTIŞMA

Karnovsky ve Badwey (2) kobay NADH-oksidad enziminin molekül ağırlığını sefaroz 6-B jel elemesi sonucu 310.000 - 14.000 olarak bulmuşlardır. Çalışmamızda ise G-200 jel elemesi ile enzimin molekül ağırlığı 280.000 olarak bulunmuştur. Aradaki fark materyalden ileri gelebileceği gibi jelden de ileri gelebilir.

Çalışmamızda enzimin alt birimlerinin ve izoenzimlerinin bulunmadığı tesbit edilmiştir ki bu bulgumuz diğer araştırmacıların bulgularına uyumaktadır (2, 12).



Şekil 2 . Enzimin substrat konsantrasyonu ile ilişkisinin A-Michaelis-Menten, B-Lineweaver-Burk grafikleri ile çizimi ($K_m = 4.8 \times 10^{-4}$ M bulunmuştur)

Araştırmamızda enzimin K_m değeri 4.8×10^{-4} olarak bulunmuştur. Cagan ve Karnovsky (12) kobay NADH-Oksidadının K_m 'sini 1×10^{-3} m, insan NADH-Oksidadının K_m sini 4×10^{-4} m olarak bulmuşlardır. Karnovsky ve Badwey (2) ise kobay NADH oksidadının K_m sini 10×10^{-4} olarak bulmuşlardır. Görüldüğü gibi araştırmamızda bulunan K_m değeri diğer araştırmacıların insan NADH oksidadı için verilen K_m değeri ile uyum içindedir.

Cagan ve Karnovsky (12) insan ve kobay NADH oksidadı için pH'yı 5, Iverson ve ark. (13) insan NADH-oksidadı için 6, bizim çalışmamızda ise 7 olarak bulunmuştur.

Enzimin NADH'ı oksitleyip oksitlemediği araştırılmış ve oksitlemediği görülmüştür. Bu bulgumuz solubl NADH oksidaz enziminin NADH için spesifik olduğunu göstermektedir ki bu bulgumuz Green ve Pratt'in (14) bulgularına uyumaktadır.

Netice olarak, insan lökositlerinden elde edilen

solubl NADH-oksidadaz enziminin NADH'a spesifik. K_m 'i 4.8×10^{-4} m, optimum pH'sı 7, optimum ısısı 37 °C olan ADP, ATP ve steroidlerce inhibe edilebilen 280.000 molekül ağırlığında ve izoenzimleri bulunmayan monomerlik yapıda bir enzim olduğu söylenebilir.

KAYNAKLAR

1. Baehner RL, Gilman N, Karnovsky ML. Respiration and glucose oxidation in human and guinea pig leukocytes comparative studies. J Clin Invest 1970;69:2.
2. Badwey AJ, Karnovsky ML. Production of superoxide and hydrogen peroxide by an NADH oxidase in guinea pig polymorphonuclear leukocytes. J Biol Chem 1979; 254: 11530.
3. Klebanoff SJ. Antimicrobial mechanism in neutrophilic polymorphonuclear leukocytes. Semin Hematol 1975; 12: 117.
4. Baehner RL, Karnovsky ML. Deficiency of reduced nicotinamide Adenine Dinucleotide Oxidase in chronic granulomatous disease. Science 1968; 162: 1278.
5. Briggs RT, Karnovsky ML, Karnovsky MJ. Cytochemical demonstration of hydrogen peroxide in polymorphonuclear leukocyte phagosomes. J Cell Biol 1978; 64: 254.
6. Winkelstein JA, Drachman RH. Phagocytosis, the normal process and its clinically significant abnormalities. Pediatr Clin North Am 1974; 21: 551.
7. Tezcan EF. İnsan serum psödokolinerazının alt birim yapısı. Doçentlik tezi, Hacettepe Ü. Tıp Fak, Ankara, 1974.
8. Sosyal ST. Glukoz-6-Fosfat dehidrogenaz enziminin insan eritrositlerinden saflaştırılması ve kinetik özelliklerinin araştırılması. Doçentlik tezi Atatürk Ü. Tıp Fak. Erzurum 1980.
9. Brawer GJ, sing CF. Specific electrophoretic systems, a introduction to isozyme techniques. London: Academic Press 1970
10. Gray WR, Colowick P, Kaplan NO. "End-Group analysis using dansyl cholomide" methods in enzymology. Volume XXV. New York: Acad Press Inc, 1972: 121.
11. Gray WR, Hartley BS. A fluorescent end-group reagent for proteins and peptides. Biochem J 1963; 89: 69.
12. Cagan RH, Karnovsky ML. Enzymatic basis of the respiratory stimulation during phagocytosis. Nature 1964: 204-55.
13. Iverson D, De Chatelet LR, Spitznagel JK, Wang P. Comparison of NADH and NADPH oxidase activities in granules isolated from human polymorphonuclear leukocytes with a fluorometric assay. J Clin Invest 1977; 59: 282.
14. Green TR, Pratt KL. Purification of the solubilized NADPH: O₂ oxidoreductase of human neutrophils J Biol Chem 1988; 263 (12): 5617-23.