

Właściwości transferazy glutationowej z mózgu świni

JACEK SAWICKI, ANNA BARAŃCZYK-KUŻMA

Katedra i Zakład Biochemii I Wydziału Lekarskiego AM, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa

Sawicki J., Barańczyk-Kuźma A.

Properties of pig brain glutathione-S-transferase

Summary

Glutathione-S-transferase (GST) inactivates toxic electrophilic compounds, binding them to reduced glutathione. As has been demonstrated in the present paper, GST is a common enzyme in the porcine central nervous system. Its activity for the electrophilic substrate (1-chloro-2,4-dinitrobenzene) and the organic peroxide (cumene peroxide) was determined in all regions of the brain cortex, in white matter, hippocampus, brain stem and cerebellum. Two isoforms of a molecular mass of approximately 40 kD were identified in each region of the brain. The isoforms showed different electrical charges, isoelectric points and substrate affinities. The main isoform contained about 90% of the total activity: its pI was 7.2. The remaining 10% of the activity were expressed by the isoform with pI 6.5. This isoform demonstrated twice the affinity for reduced glutathione and for electrophilic substrate than the major isoform pI 7.2. The presence of two isoforms in all the studied regions of the brain indicates that glutathione-S-transferases play an important role in protecting the central nervous system against toxic electrophiles.

Keywords: pig, brain, glutathione-S-transferase

Mózg jest chroniony przed działaniem różnego rodzaju związków chemicznych przez specyficzną barierę anatomiczną utworzoną przez komórki śródbłonna naczyń włosowatych, określaną jako bariera krew-mózg (BBB; blood-brain barrier). Drugą, równie istotną osłonę stanowi bariera biochemiczna utworzona przez układy enzymatyczne katalizujące reakcje biotransformacji. Efektem większości z tych reakcji jest inaktywacja oraz ułatwienie wydalania metabolizowanego związku z organizmu. Następuje to w wyniku przyłączenia grup chemicznych o charakterze hydrofilowym, co zwiększa rozpuszczalność powstałego produktu w wodzie. Procesom biotransformacji mogą ulegać zarówno związki egzo- (toksyny, konserwanty, kancerogeny, leki), jak i endogenne (bilirubina, hormony, neuroprzekazniki) (6, 9, 15). Pomimo iż głównym narządem odpowiedzialnym za procesy detoksykacji jest wątroba, liczne badania wykazały obecność enzymów biotransformacji również w innych narządach, w tym w mózgu (10).

Transferaza glutationowa (GST, EC. 2.5.1.18) tworzy najważniejszy system obronny zabezpieczający organizmy żywe przed działaniem reaktywnych związków elektrofilowych (7). Katalizuje reakcje sprzęgania tych związków ze zredukowanym glutationem. Enzym wykazuje niską specyficzność substratową oraz występuje w formie licznych izoenzymów, co umożliwia mu przekształcenie znacznej ilości związków chemicznych.

Celem badań była charakterystyka transferaz glutationowych wyizolowanych z różnych części mózgu świni.

Material i metody

Mózgi świń otrzymywano z rzeźni, bezpośrednio po uboju zwierząt. Z mózgu wypreparowywano korę płata czołowego, ciemieniowego, potylicznego i skroniowego, hipokamp, pień mózgu, mózdzek i istotę białą. Tkanki homogenizowano w 10 mM buforze fosforanowym pH 6.5, zawierającym 0,25 M sacharozę, w stosunku 1 : 4. Homogenat ekstrahowano w lodzie przez 15 minut, a następnie wirowano przez 15 minut przy $15\,000 \times g$. Osad odrzucono, a supernatant wirowano przez 60 minut przy $100\,000 \times g$ uzyskując frakcję cytozolową, w której oznaczano aktywność i białko. Otrzymany cytozol poddawano chromatografii jonowymiennej na DEAE-Sephadexie A-25.

Aktywność transferazy glutationowej oznaczano wg Habig i wsp. (5), w modyfikacji Fujita i wsp. (4), stosując jako substrat elektrofilowy 1-chloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB). Aktywność peroksydazową oznaczano wobec nadtlenu kumenu metodą Wendel (14). Aktywność specyficzną GST wyrażano w mikromolach powstałego produktu na miligram białka, na minutę. Białko oznaczano wg Bradford (3). Punkt izoelektryczny (pI) oznaczano przy użyciu aparatu Rotofor Prep-Cell 491 firmy BIORAD. Stałe Michaelisa-Mentena (Km) wyznaczono metodami graficznymi wg Linerweavera-Burka. Ciężar cząsteczkowy oznaczano metodą sączenia molekularnego na kalibrowanej kolumnie z żelom Sephadex G-100.

Wyniki i omówienie

Transferaza glutationowa jest obecna w mózgu szczura, małpy i człowieka (1, 8, 13), a także, jak wykazano w obecnej pracy, w różnych częściach mózgu świni. Aktywność transferazowa w różnych płatach kory mózgowej jest podobna i wynosi około 0,2 $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$. Jest ona około 50% niższa niż w innych rejonach mózgu, takich jak: hipokamp, pień mózgu i mózdzek, ale prawie czterokrotnie wyższa niż w istocie białej mózgu. Aktywność peroksydazowa jest niższa w różnych częściach kory mózgu niż w pozostałych rejonach mózgu, szczególnie niska jest ona w korze skroniowej (tab. 1). Zróznicowana ekspresja transferaz glutationowych sprawia, że poszczególne tkanki posiadają inny zestaw izoenzymów, co prowadzi do różnic w zdolnościach biotransformacji związków chemicznych. Ta zmienność może występować również w obrębie tej samej tkanki różnych gatunków (11).

Z frakcji cytozolowej każdej z badanych części mózgu, metodą chromatografii jonowymiennej na DEAE-Sephadex A-25, wyizolowano po dwie formy transferazy glutationowej: nie adsorbującą się na kolumnie i wmywaną buforem oraz adsorbującą się i wmywaną w gradiencie liniowym KCl (ryc. 1). Stwierdzono, że dominująca we wszystkich badanych częściach mózgu jest forma nie adsorbująca się na DEAE-Sephadexie. Forma ta zawiera od 88% (kora płata potylicznego) do 97% (kora płata ciemieniowego) całkowitej aktywności (ryc. 2). Podobnie jak w mózgu wołu (2), nie stwierdzono występowania trzeciej formy, obecnej w mózgu człowieka (13). Punkt izoelektryczny form wyizolowanych z mózgu świni leży w zakresie pH obojętnego i wynosi 7,2 dla formy nie adsorbującej się oraz 6,5 dla formy adsorbującej się na DEAE-Sephadexie. Wartość pI transferaz glutationowych z mózgu świni jest inna niż izoform z mózgu człowieka (4,6; 5,3; 8,9) (13), ale podobna do form izolowanych z mózgu szczura, wśród których znajdują się transferazy o pI 7,5 i 6,6 (12).

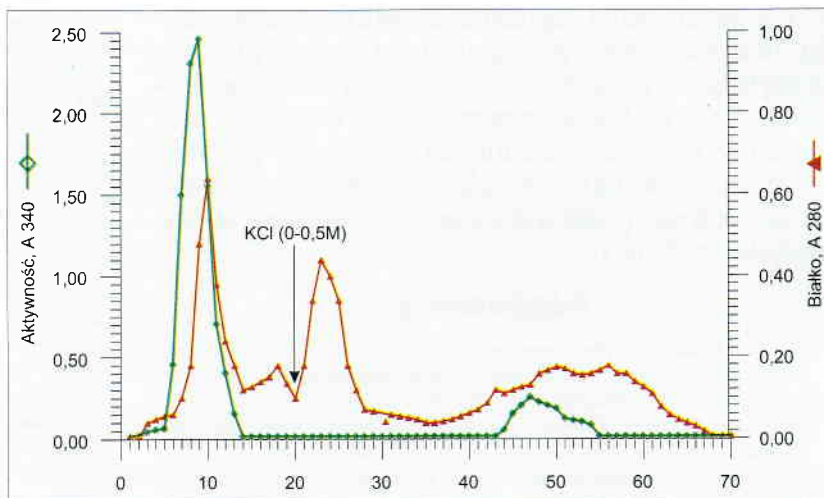
Obie formy GST wyizolowane z różnych części mózgu świni posiadają podobne powinowactwo do CDNB i GSH, ale powinowactwo formy o pI 6,5 (mniej aktywnej) do każdego z substratów jest dwukrotnie wyższe niż formy o pI 7,2 (główniej). Wskazuje to, iż pomimo niskiej aktywności forma ta może pełnić istotną rolę w procesie biotransformacji związków elektrofilowych w mózgu.

Badane transferazy z mózgu świni różnią się ruchliwością w polu elektrycznym i rozdzielają podczas elektroforezy w żelu

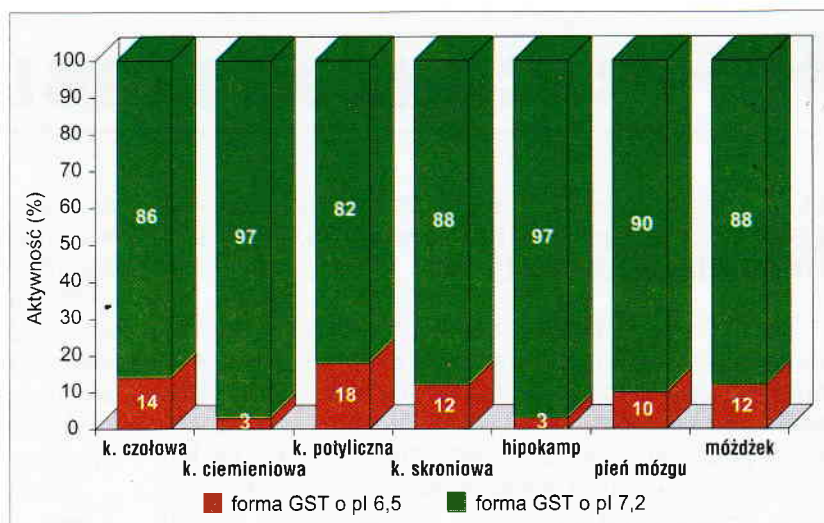
Tab. 1. Aktywność transferazy glutationowej w cytozolu różnych części mózgu świni

Część mózgu	Aktywność transferazowa ($\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$)	Aktywność peroksydazowa ($\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min} \times 10^{-2}$)
Kora płata czołowego	0,235 \pm 0,017	0,590 \pm 0,010
Kora płata ciemieniowego	0,236 \pm 0,013	1,005 \pm 0,045
Kora płata potylicznego	0,244 \pm 0,023	0,825 \pm 0,025
Kora płata skroniowego	0,204 \pm 0,008	0,430 \pm 0,015
Hipokamp	0,353 \pm 0,048	1,150 \pm 0,250
Pień mózgu	0,373 \pm 0,070	1,362 \pm 0,330
Mózdzek	0,329 \pm 0,052	1,274 \pm 0,226
Istota biała	0,059 \pm 0,008	1,181 \pm 0,030

poliakrylamidowym. Wartość współczynnika Rf dla formy o pI 7,2 oznaczona podczas elektroforezy w żelu



Ryc. 1. Rozdział chromatograficzny transferaz glutationowych z kory płata ciemieniowego mózgu świni. Frakcję cytozolową nakładano na kolumnę z DEAE-Sephadexem A-25 zrównoważoną 10 mM buforem sodowo-fosforanowym pH 7,6. Zbierano frakcje po 5 ml, w których oznaczano aktywność i białko



Ryc. 2. Rozkład aktywności całkowitej pomiędzy izoformy transferazy glutationowej rozdzielone metodą chromatografii jonowymiennej na DEAE-Sephadexie A-25

poliakrylamidowym w pH 8,9 wynosi 0,5, a dla formy o pI 6,5 wynosi ona 0,75.

Masa cząsteczkowa badanych form wynosi około 40 kD i jest podobna do masy cząsteczkowej transferaz glutationowych z mózgu innych ssaków (6, 8, 10, 13).

Podsumowanie

Od dawna znany jest udział takich enzymów, jak: monoaminooksydaza (MAO), metylotransferaza katecholowa (COMT), czy sulfotransferaza fenolowa (PST) w biotransformacji związków chemicznych, działających w ośrodkowym układzie nerwowym. Jednak wciąż są nieliczne dane na temat udziału transferaz glutationowych w unieczynnianiu toksycznych związków elektrofilowych w mózgu ssaków.

Przedstawione badania wykazały, że u świni enzymy te występują we wszystkich płatach kory mózgowej, w istocie białej, hipokampie, pniu mózgu i móżdżku. W każdej części występują dwie izoformy różniące się właściwościami fizykochemicznymi i kinetycznymi. Powszechność występowania w mózgu oraz obecność izoform wskazują, że transferazy glutationowe pełnią istotną rolę w ochronie ośrodkowego układu nerwowego przed toksycznym działaniem związków elektrofilowych.

Piśmiennictwo

1. Barańczyk-Kuźma A., Barszczewska I., Audus K. L.: The effect of exo- and endogenous compounds on the activity of glutathione-S-transferase from monkey brain. *Acta Biochim. Pol.* 1992, 39, 133-138.
2. Barańczyk-Kuźma A., Drobisz D.: Heterogeneity of the bovine brain glutathione S-transferase. *Acta Biochim. Polon.* 1993, 40, 100-102.
3. Bradford M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976, 72, 248-54.
4. Fujita E., Kitagawa H., Ishizawa H., Suzuki T., Kitani K.: Age associate alterations in hepatic glutathione-S-transferase activity. *Biochem. Pharmacol.* 1985, 34, 3891-3894.

Tab. 2. Powinowactwo transferaz glutationowych z mózgu świni

Część mózgu	Zmienny substrat			
	GST o pI 7,2		GST o pI 6,5	
	GSH	CDNB	GSH	CDNB
Km (mM)				
Kora płata ciemieniowego	0,66 ± 0,13	0,80 ± 0,25	0,34 ± 0,07	0,40 ± 0,08
Hipokamp	0,89 ± 0,17	0,92 ± 0,21	0,44 ± 0,06	0,46 ± 0,07
Pień mózgu	0,68 ± 0,03	0,58 ± 0,05	0,36 ± 0,04	0,38 ± 0,09

5. Habig W. H., Pabst M. J., Jakoby W. B.: Glutathione-S-transferases. The first step in mercapturic acid formation. *Biochem. Pharmacol.* 1974, 249, 7130-7139.
6. Hayes J. D., Pulford D. J.: The glutathione-S-transferase supergene family regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 1995, 30, 445-600.
7. Jakoby W. B.: The glutathione-S-transferases: a group of multifunctional detoxication proteins. *Adv. Enzymol.* 1985, 46, 383-414.
8. Kubota T., Miyaura S., Isono H.: Glutathione S-transferases in rat extrahepatic tissues: immunologic relation to hepatic neutral glutathione S-transferase in the diethylaminoethyl-cellulose-bound fraction. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 1985, 33, 2044-2051.
9. Listowsky I., Abramowitz M., Homma H., Niitsu Y.: Intracellular binding of hormones and xenobiotics by glutathione-S-transferases. *Drug Metab. Rev.* 1988, 19, 305-318.
10. Mulder G. J.: Conjugation reactions in drug metabolism. (Wyd.) Mulder G. J., Taylor&Francis, London 1990.
11. Pabst M. J., Habig W. H., Jakoby W. B.: Glutathione S-transferase. A novel kinetic mechanism in which the major reaction pathway depends on substrate concentration. *J. Biol. Chem.* 1974, 249, 7140-7147.
12. Singh S. V., Saunders M. O., Moller P. C., Haber B., Awasthi Y. C.: Comparative studies on the isoenzymes of glutathione S-transferase of rat brain and other tissues. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 1987, 86, 73-81.
13. Theodore C., Singh S. V., Hong T. D., Awasthi Y. C.: Glutathione-S-transferases. *Biochem J.* 1985, 225, 375-382.
14. Wendel A.: Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 1981, 77, 325-333.
15. Yabuno T., Konishi N., Nakamura M., Tsuzuki T., Tsunoda S., Sakaki T., Hiasa Y.: Drug resistance and apoptosis in ENU-induced rat brain tumors treated with anti-cancer drugs. *J. Neurooncol.* 1998, 36, 105-112.

Adres autora: dr n. med. Jacek Sawicki, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa; e-mail: sawic@amwaw.edu.pl

❖❖❖❖ RECENZJE I BIBLIOGRAFIA ❖❖❖❖

EGO – wspomnienia lekarzy weterynarii. Red. Jan Krupa. Wyd. Prywat. Białystok, 2003. str. 242, ryc. 126. ISBN 83-882248-73-1

Tytuł książki – EGO – wydaje się zagadkowy. Kryje się pod nim skrót – akronim – od 3 powiatów w województwie warmińsko-mazurskim: Ełk, Gołdap i Olecko. Natomiast treścią opracowania są wspomnienia 31 lekarzy wet., którzy pracowali (a niektórzy dotąd tam mieszkają) lub którzy przebywali w tych stronach przez pewien czas swego życia. Jest to bardzo specyficzny, ale i intrygujący opis odbioru emocjonalnego ludzi, którzy znaleźli się, czasami tylko przez przypadek, w tej części Polski i przez swoją pracę czują się ciągle związani z tym regionem. Zapewne

tamtejsze specyficzne okolice i związki międzyludzkie w początkowym okresie życia zapisały się trwale w pamięci autorów wspomnień.

Wspomnienia są bardzo zróżnicowane treściowo. Od tylko jednej stroniczki do szerszych wspomnień i emocjonalnych wzruszeń. Czyta się te opisy, zwłaszcza będąc samemu członkiem tej profesji, z zainteresowaniem i ciekawością. Jest to niewątpliwie dobre świadectwo pracy i życia naszych kolegów. Warto się z tym zapoznać.

Spiritus movens powstania tych wspomnień jest dr Jan Krupa, znany w świecie weterynaryjnym kolega dobrej aktywności i inicjatywy, a przy tym piewca zawodu słowem pisany. Chwała mu!

Edmund K. Prost