

Normal ve Çinko Eksikliği Olan Ratlarda Karaciğer ve Böbrek Metallothioneininin Kısmen Saflaştırılması ve Serum Çinko Seviyeleri ile Karşılaştırılması*

H.Sezer YARIMAGAN
Naci M. BOR
HasanDEREAĞZI

THE PARTIEL PURIFICATION OF LIVER AND KIDNEY
METALLOTHIONEIN FROM NORMAL AND ZINC-DEFICIENT
RATS AND ITS COMPARISON WITH SERUM ZINC LEVELS

Geliş Tarihi: 22 Haziran 1989
Kabul Tarihi: 1 Temmuz 1989

Hacettepe Üniv. Tıp Fak. Cerrahi Araştırma Merkezi, ANKARA

ÖZET

Normal ve çinko eksikliği olan ratlarda karaciğer ve böbrek metallothioneini kısmen saflaştırıldı ve serum çinko düzeyleri ile ilişkisi incelendi. Kontrol grubundaki rotlar 21 gün süre ile standart laboratuvar diyeti ve musluk suyu ile, deney grubundakiler ise çinko-eksik diyet ve deionize su ile beslendiler. Bu sürenin sonunda hayvanlar öldürüldü, karaciğer ve böbrek örnekleri alınarak ultrasantrifüj ile sitozol fraksiyonu hazırlandı ve sefadex G-75 kolon kromatografisine uygulandı. Kolon bölümümüzde geliştirilmiş olup çift cidarlıdır ve gel dıştan buzla soğutulmuş 0°C'de tutulmaktadır. Biyolojik aktif çinko kontrol grubu karaciğer sitozolünde 2.06 kere, böbrek sitozolünde 1.91 kere saflaştırıldı. Çinko yetmezliği olan ratlarda bu çinko fraksiyonu görülmedi.

Anahtar Kelimeler: Metallothionein, Sephadex G-75 kolon kromatografisi.

T Kİ Tıp Bil Araş Dergisi C.8, S.41990,419-424

SUMMARY

Experiments were carried out on two groups of rats to study the relation of serum zinc levels and tissue metallothioneins. Rats in the control group were maintained on standard laboratory chow and tap water ad lib. Rats in experimental group were fed zinc-deficient diet and deionized water for 21 days. At the end of this period the animals were sacrificed, their livers and kidneys were removed, homogenized and the cytosolic fractions were prepared by ultracentrifugation and were applied to Sephadex G-75 column chromatography. The method utilized was developed in our department as an ice jacketed column and gel filtration was performed at 0°C. Biologically active zinc was purified 2.06 fold in hepatic and 1.91 fold in renal cytosol of the control group this fraction was not observed in the zinc deficient group.

KeyWords: Metallothionein, Sephadex G-75 Column chromatography.

T J Research Med Sci V.8, N.4,1990,419-424

GİRİŞ

Hepatik ve intestinal çinko metabolizmasının önemli bir komponenti metallothioneindir (1,2). Bu protein ilk kez kadmium toksikolojisindeki rolü ile dikkati çekmiş daha sonra bir çinko thionein olduğu gösterilmiştir (3).

Karaciğer ve ince barsakta metallothioneine bağlanan çinko diyetle alınan miktar ile doğrudan bağlantılıdır. Deney hayvanlarında ve insanda

yapılan çalışmalarda oral ve parenteral çinko birikimi ve metallothionein biyosentezinin arttığı gösterilmiştir (4,5). Hepatik çinko birikimi ve metallothionein sentezinin indüklenmesi önceden actinomycin D, corydopsin veya cycloheximid verilmesi ile engellenir. Çinko-eksik diyetle beslenen ratlarda metallothioneine bağlı çinko ölçülemeyecek kadar azalır, diyetle çinko eklendiğinde belirgin olarak artar (4-6). Karaciğerde metallothionein

* Bu çalışma TÜBİTAK Araştırma Eğitimi ve Uygulama Ünitesi İle Anadolu Sağlık ve Araştırmalar Vakfı tarafından desteklenmiştir.

Tablo 1. Sefadeks G-75 Kolonunun Çinko ve Protein Olarak Verimi

| | Zn ²⁺ (u.g) | | | Protein (mg) | | |
|-----------------------|------------------------|-------|---------|--------------|--------|---------|
| | Giren | Çıkan | % verim | Giren | Çıkan | % verim |
| Kontrol Gr. Karaciğer | 6333 | 6080 | 96 | 132.15 | 122.80 | 93 |
| Deney Gr. Karaciğer | 6650 | 6450 | 97 | 147.30 | 135.60 | 92 |
| Kontrol Gr. Böbrek | 2490 | 2364 | 95 | 42.33 | 38.52 | 91 |
| Deney Gr. Böbrek | 2115 | 2010 | 95 | 36.78 | 34.56 | 94 |

olarak biriken çinko açlıkta artar, actinomycin D bu birikmeyi önler, bu da de-novo protein sentezi gerektiğini gösterir (7). Bakteriyel enfeksiyonda ve travmada plazma çinkosunda azalma olur ve hepatik metallothionein miktarı artar (8,9). Karbon tetraklorür veya streptozotosin ile deneysel diabet oluşturulan ve yanık, şiddetli egzersiz. Soğuk, sıcak gibi streslere maruz bırakılan ratlarda da benzer sonuçlar alınmıştır (2,10).

Karaciğerde metallothionein biyosentezini etkileyen deneysel şartların başlıcaları artiritler, alkilleyici ajanlar, kadmium, bakır, endotoksin, epinefrin, glukokortikoidler, glukagon, interleukin ve isoproponoldür (1).

Metallothionein çeşitli türlerin karaciğer, böbrek ve ince barsak mukozalarından saflaştırılmış ve 6-7000 dalton molekül ağırlığında aromatik amino asit ihtiva etmeyen, primer yapının üçte birine yakını sistemden oluşan tek bir polipeptid olduğu gösterilmiştir. Saflaştırmada kullanılan başlıca metodlar sefadeks G-75 ve DEAE-sefadeks kolon kromatografileri ile ultrasantrifüjdür (11-14).

MATERYAL VE METOD

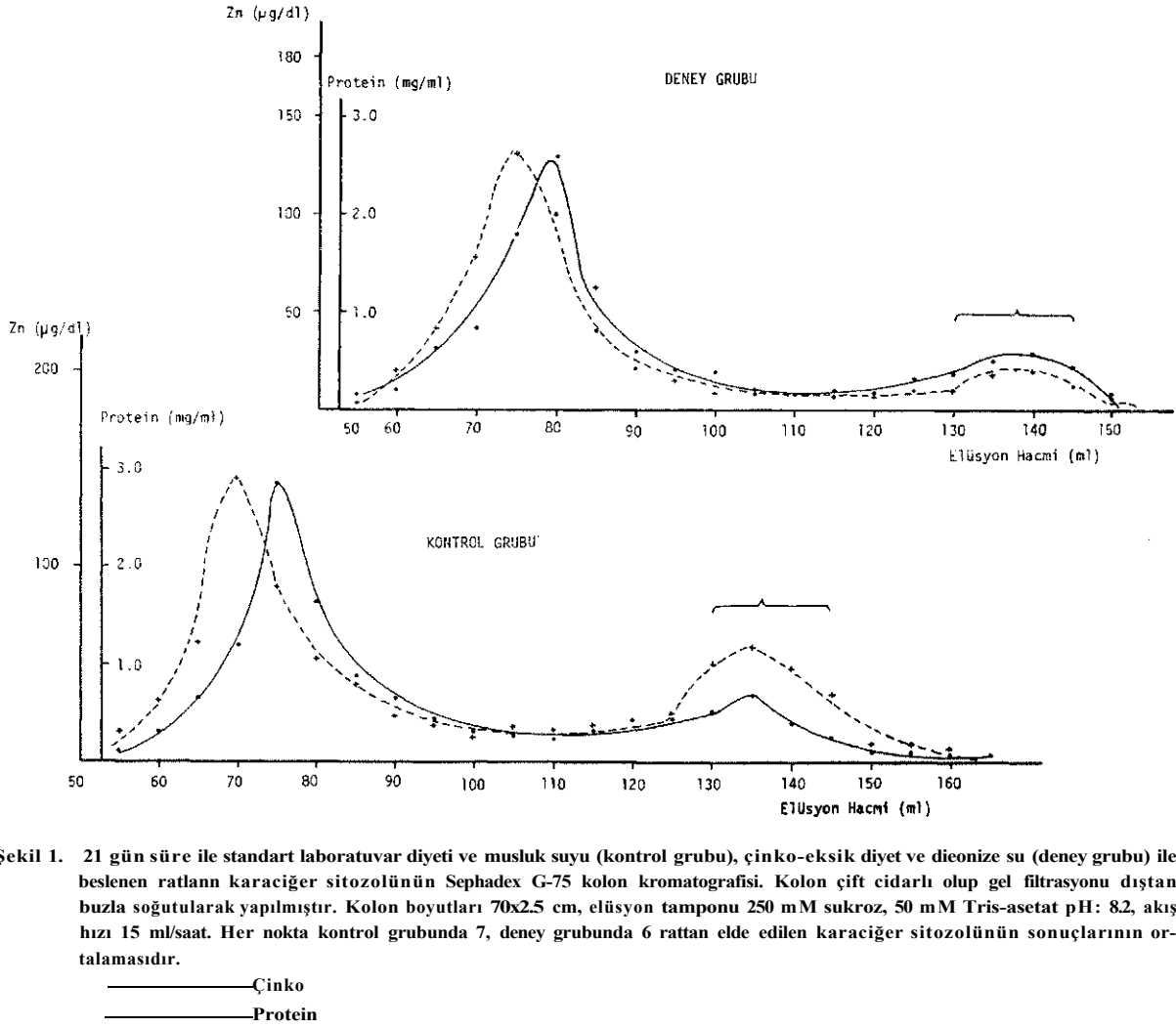
Deneyler Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Laboratuvarlarından sağlanan 150-200 gr ağırlığında erkek ratlarda yapıldı. Kontrol grubunu oluşturan 7 rat 21 gün süre ile özel metabolik kafeste korundu, standart laboratuvar diyeti ve musluk suyu ile, deney grubunu oluşturan 6 rat ise aynı kafeslerde çinko eksik diyet ve deionize su ile beslendiler. Belirtilen sürenin sonunda hayvanlar öldürüldü, kan, karaciğer ve böbrek örnekleri alındı.

Kan örneklerinin serumu ayrılarak atomik absorpsiyon spektrofotometresi (AAS) ile çinko ölçümü yapıldı. Karaciğer ve böbreklerden 1 gr kadar örnek alındı, dıştan buzla soğutulmuş Potler Elvejhem cam-teflon homojenizatörle gr/2 ml 250 mM sukroz, 50 mM Tris-asetat pH: 8.2 tamponu içinde homojenize edildikten sonra Beckman ultrasantrifüjde 100.000 g'de 20 dak santrifüj edildi, elde edilen süpernatant (sitozol) Sefadeks G-75 kolonuna uygulandı.

Sefadeks G-75 soğutulmuş kolonu bölümümüzde geliştirilmiş olup çift cidarlıdır, iç içe iki silindirik kolondan oluşmaktadır. Dıştaki (jacked) kolonda kırılmış buz mevcuttur ve içtekinin 0°C'de tutulmasını sağlamaktadır. Kolon boyutları 70x2.5 cm olup, 250 mM sukroz, 50 mM Tris-asetat pH: 8.2 elüsyon tamponu ile dengelendi. Akış hızı 15 ml/saat olarak ayarlandı ve her 5 ml birtüpe alınarak AAS ile Zn²⁺ ölçümü (15) ve Warburg, Christian metodu (16) ile protein tayinleri yapıldı.

SONUÇLAR

Kontrol grubundaki 7 rat ve deney grubundaki 6 ratın karaciğer sitozolünün Sefadeks G-75 kolon kromatografisi sonuçları Şekil 1'de özetlenmiştir. Kontrol grubunda birincisi 80-90, ikincisi 150-160 ml elüsyon hacminde iki protein ve beraberinde iki çinko zirvesi gözlemlendi. Birinci zirve yüksek molekül ağırlıklı (> 75.000 dalton) proteinlere bağlı çinkoyu göstermektedir. İkincisi ise düşük molekül ağırlıklı proteinlere bağlı çinkoyu göstermekle ve metallothionein ihtiva etmektedir. Bu farksiyonun Zn /protein oranı Sefadeks kolonuna uygulanan karaciğer sitozolüne göre 2.06 kere fazladır, başka bir deyişle biyolojik aktif çinko 2.06 kere



Şekil 1. 21 gün süre ile standart laboratuvar diyeti ve musluk suyu (kontrol grubu), çinko-eksik diyet ve deionize su (deney grubu) ile beslenen ratların karaciğer sitozolünün Sephadex G-75 kolon kromatografisi. Kolon çift cidarlı olup gel filtrasyonu dıştan buzla soğutulmuş yapılmıştır. Kolon boyutları 70x2.5 cm, elüsyon tamponu 250 mM sukroz, 50 mM Tris-asetat pH: 8.2, akış hızı 15 ml/saat. Her nokta kontrol grubunda 7, deney grubunda 6 rattan elde edilen karaciğer sitozolünün sonuçlarının ortalamasıdır.

— Çinko
- - - Protein

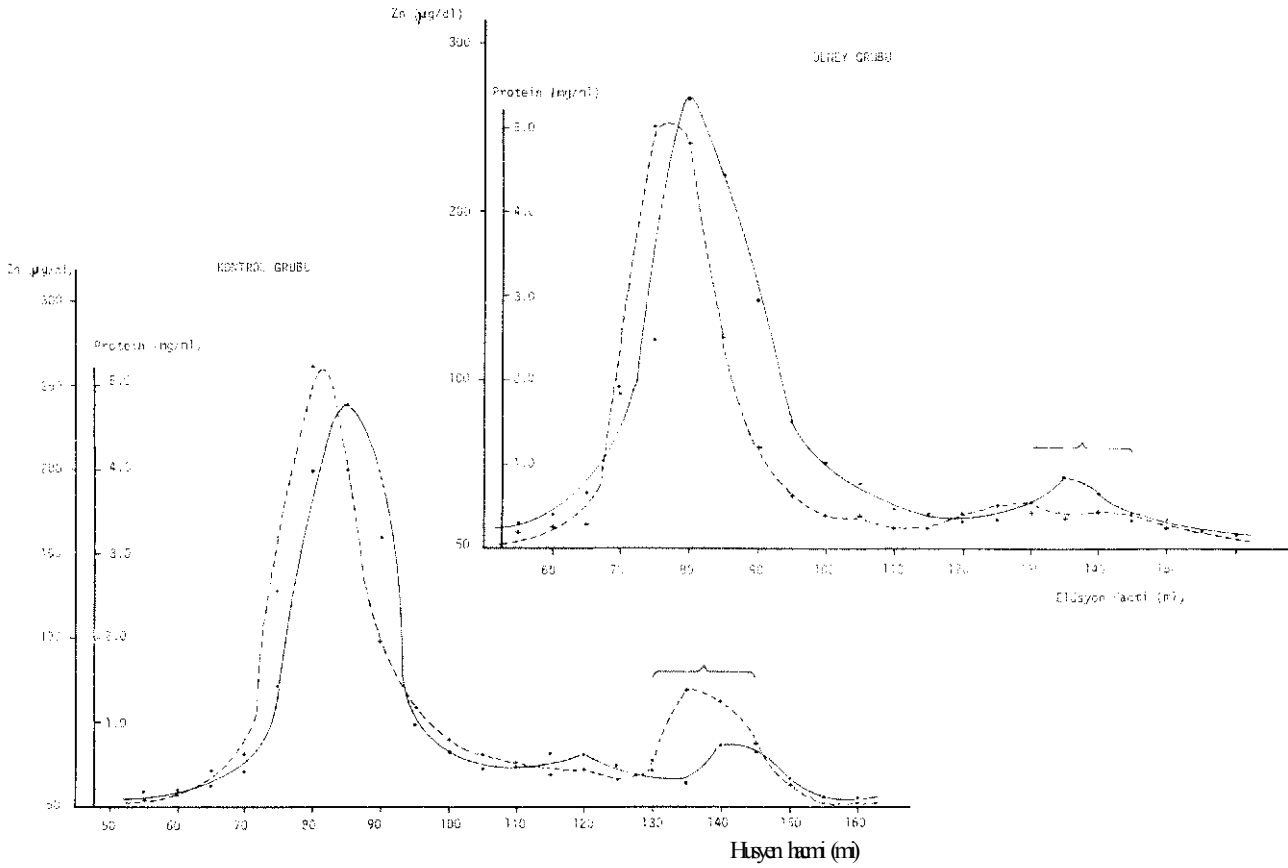
saflaştırılmıştır. Kolonun verimi proteinler yönünden % 93, çinko yönünden % 96'dır (Tablo 1).

Çinko eksikliği oluşturulan deney grubuna 80-90 ml elüsyon hacminde bir protein ve beraberinde bir çinko zirvesi gözlemlendi. 140 ml elüsyon hacmindeki ikinci protein zirvesinde ise çinkoda belirgin bir artış yoktu. Bu fraksiyon düşük molekül ağırlıklı proteinlere ve metallothioneine bağlı çinkoyu göstermektedir. İkinci protein zirvesinin Zn /protein oranında kontrol grubunda meydana gelen artma deney grubunda görülmedi. Kolonun verimi protein yönünden % 92, çinko yönünden % 97'dir (Tablo 1).

Böbrek sitozolünün Sefadex G-75 kolon kromatografisi sonuçları Şekil 2'de görülmektedir.

Kontrol grubunda birincisi 90-100, ikincisi 150-160 ml elüsyon hacminde iki protein ve beraberinde iki çinko zirvesi gözlemlendi. Karaciğerdekine benzer şekilde birinci zirve yüksek molekül ağırlıklı (> 75.000 dalton) proteinlere bağlı çinkoyu göstermektedir. İkinci ise metallothionein ve düşük molekül ağırlıklı proteinlere bağlı çinkoyu göstermektedir. Kolona uygulanan böbrek ekstresinde Zn²⁺/protein oranı 58.8'dür. İkinci protein zirvede bu oran 112 olup kromatografisi sonucunda iki kere kadar artmıştır, yani aktif çinko saflaştırılmıştır. Kolonun verimi çinko için % 95, proteinler için % 91'dir (Tablo 1).

Çinko eksikliği oluşturulan deney grubunda 90 ml elüsyon hacminde bir protein ve beraberinde



Şekil 2. 21 gün süre ile standart laboratuvar diyeti ve musluk suyu (kontrol grubu), çinko-eksik diyet ve deionize su (deney grubu) ile beslenen ratların böbrek sitozolünün Sephadex G-75 kolon kromatografisi. Kolon çift cidarlı olup gel filtrasyonu dıştan buzla soğutulmuş. Kolon boyutları 70x2.5 cm, elüsyon tamponu 250 mM sukroz, 50 mM Tris-asetat pH: 8,2, akış hızı 15 ml/saat. Her nokta kontrol grubunda 7, deney grubunda 6 rattan elde edilen böbrek sitozolünün sonuçlarının ortalamasıdır.

— Çinko
— Protein

bir çinko zirvesi gözlemlendi. Bu yüksek molekül ağırlıklı proteinlere bağlı çinkodur (> 75.000 dalton). 150 ml elüsyon hacmindeki ikinci protein zirvesinde ise kontrol grubundaki çinko artışı görülmedi. Bu fraksiyonda Zn^{2+} /protein oranı kolona giren böbrek sitozolüne göre artma göstermedi. Kolonun verimi çinko için % 95, protein için % 94'dür (Tablo 1).

Kontrol grubu ratların serum çinko düzeyleri 144.9 ± 12.1 deney grubundakilerin 114.7 ± 10.2 u.g/dl olup aradaki fark istatistiksel bakımdan önemlidir ($p < 0.001$) ve çinko yetmezliği meydana gelmiştir.

TARTIŞMA

Metallothionein ilk kez Kagi ve arkadaşları tarafından at böbreğinde bulundu ve saflaştırıldı.

Metallothionein I ve II olmak üzere başlıca iki isometallothionein vardır, bunların amino asit bileşimleri bir miktar farklı olup DEAE-ion değiştirici kromatografi veya "gel permetion high-performance liquid chromatography" ile ayrılabilir (17,18). DNA-dizi çalışmaları ile doku ekstratlarında "reverse phase HPLC" ile yapılan çalışmalar ikiden fazla metallothionein geni ve isometallothionein olduğunu göstermiştir (19).

Metallothioneinin metal-bağlama bölgeleri çok ilgi çekmiştir. İlk çalışmalar metal bağlanmasından sisteinil radikallerinin sorumlu olduğunu göstermiştir. Cd-NMR ile yapılan daha sonraki çalışmalarda protein molekülünün iki salkımdan oluştuğu, metal ionlarının dördünün bir salkımda,

diğer üçünün diğer salkımda tiol ligandı yapacak şekilde yerleştiği gösterilmiştir (20).

Metallothionein çeşitli hayvan türleri ve dokularından saflaştırılmıştır. En ayrıntılı olarak incelenenler karaciğer, böbrek ve ince barsak metallothioneinleridir. Erişkin karaciğer metallothioneini bir çinko-protein olup fizyolojik şartlarda bakır da bağlaması her iki eser element metabolizması ile de ilgili olduğunu gösterir (21,22). Fetal insan karaciğer metallothioneini çözünür fraksiyondan saflaştırıldığında başlıca çinko ihtiva eder, partiküllü kısımdan elde edilen metallothionein ise daha fazla bakır ile birleşmiştir (23,24). Pre- ve neonatal periyotta rat ve koyun karaciğerinde bol

miktarda metallothionein bulunur ve bakırca zengindir (25,26).

Bizim çalışmamızda normal ve çinko eksikliği yapılan rat karaciğer ve böbreklerinde metallothionein saflaştırılmasının ilk basamağı olan sefadeks G-75 kolon kromatografisi yapıldı. Bulgularımız literatürdeki bilgilere uymaktadır (1,2,4,8,11). Çalışmalarımız proteinin daha ileri saflaştırmasını yapmak, serum ve doku çinko seviyeleri ve bazı metalloenzim miktarları ile karşılaştırmak ve radyasyonun etkilerini incelemek yönünden devam etmektedir.

Not: Proteinlerin ölçümünde değerli yardımlarını gördüğümüz Prof.Dr. Çiğdem Altay'a teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Cousins RT: Absorption, transport and hepatic metabolism of copper and zinc: Special reference to metallothionein and ceruloplasmin. *Physiological Reviews* 65: 238-309,1985.
2. Cousins RJ: Regulatory aspects of zinc metabolism in liver and intestines. *Nutrition Reviews* 37: 97-103, 1979.
3. Perry HM Jr, Thind GS, Perry BP: The biology of cadmium. *Med Clin N Amer* 60: 799-812,1976.
4. Richards MP, Cousins RJ: Metallothionein and its relationship in the metabolism of dietary zinc in rats. *J Nutr* 106:1591-1599,1976.
5. Smith KT, Cousins RJ, Silbon EI, Failla ML: Zinc absorption and metabolism by isolated, vascularly perfused rat intestine. *J Nutr* 108:1849-1857,1978.
6. Richards MP, Cousins RJ: Isolation of an intestinal metallothionein induced by parenteral zinc. *Biochem Biophys Res Commun* 75: 286-294,1977.
7. Richards MP, Cousins RJ: Mammalian zinc homeostasis: Requirement for RNA and metallothionein synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 64: 1215-23,1975.
8. Chen RW, Vasey EJ, Whanger PD: Accumulation and depletion of Zinc in rat liver and kidney metallothioneins. *J Nutr* 107: 805-13,1977.
9. Sobocinski RZ, Canterbury WJ, Mapes CA, Dinterman RE: Involvement of hepatic metallothioneins in hypozincemia associated with bacterial infection. *Am J Physiol* 234: E399-E406,1978.
10. Oh Sil, Deager JT, Whanger PD, Weswig PH: Biological function of metallothionein. Its induction in rats by various stresses. *Am J Physiol* 234: E282-E285,1973.
11. Bremner J, Davies NT: The induction of metallothionein in rat liver by Zinc injection and restriction of food intake. *Biochem J* 149: 733-739, 1975.
12. Squibb KS, Cousins RJ, Feldman SL Control of Zinc-thionein synthesis in rat liver. *Biochem J* 164: 223-228, 1977.
13. Richards MP, Cousins RJ: Mammalian Zinc homeostasis: Requirement for RNA and metallothionein synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 64: 1215,1975.
14. Richards MP, Cousins RJ: Influence on parenteral Zinc and actinomycin D on tissue Zinc uptake and synthesis of a Zincbinding protein. *Bioorg Chem* 4: 215-224,1975.
15. Analytical Methods for Atomic Absorption Spectrophotometry. Perkin-Elmer, Norwalk Connecticut, USA.
16. Warburg O, Christian W: Determination of protein. *Biochem J* 310: 384,1942.
17. Pulido P, Kagi JHR, Valee BL: Isolation and some properties of human metallothionein. *Biochemistry* 5: 1768-1777,1981.
18. Suzuki KT, Maitani T: Metal-dependent properties of metallothionein. *Biochem J* 199: 289-295,1981.
19. Karin M, Richards RJ: Human metallothionein genes-primary structure of the metallothionein-II gene and a related processed gene. *Nature (Lond)* 299: 797-802,1982.
20. Klausner SJ, Kagi IIR, Wilson KJ: Characterization of isoprotein pattern in tissue extracts and isolated samples of metallothioneins by reverse-phase high pressure liquid chromatography. *Biochem J* 299: 71-80,1983.

21. Buhler RHO, Kagi HIR: Human hepatic metallothioneins. FEBS Lett 39: 229-234, 1983.
22. Richards MP, Cousins JR: Zinc-binding protein to short term changes in zinc metabolism. Proc Soc Exp Biol Med 153: 52-56, 1976.
23. Riordan RJ, Jalicoeur-Paquet: Metallothionein accumulation may account for intracellular copper retention in Menkes' disease. J Biol Chem 257: 4639-45, 1982.
24. Ryden I., Deutsch HF: Preparation and properties of the major copper binding component in human fetal liver, its identification as metallothionein. J Biol Chem 253: 519-524, 1978.
25. Bell JU: Metallothionein-like protein in the hepatic cytosol of the term fetus. Toxicol Appl Pharmacol 48: 139-144, 1979.
26. Bremner I, Williams RB, Young BW: Distribution of copper and zinc in the liver of the developing sheep fetus. Br J Nutr 39: 87-92, 1977.