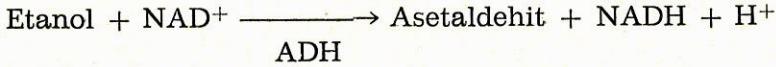


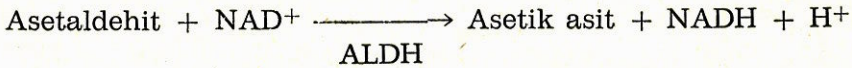
İNSAN ERİTROSİT ALDEHİT DEHİDROGENAZININ KISMEN SAFLAŞTIRILARAK KİNETİK ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

Zuhal Yurtaslanı*

Alkollü içeceklerle alınan etanolün metabolize edilmesi esnasında meydana gelen asetaldehit, alkolün farmakolojik ve biokimyasal etkilerinin meydana gelmesinde önemli bir rol oynamaktadır (3,8). Alınan etanolün büyük bir kısmı karaciğerde metabolize edilmekte, çok az bir kısmı ise değişmeden ter, idrar ve akciğerlerle atılmaktadır (16, 17). Bu sebeple asetaldehit başlıca karaciğerde meydana gelir. Reaksiyonu katalizleyen enzim alkol dehidrogenazdır (ADH) ve bu reaksiyon aşağıda gösterildiği şekilde meydana gelmektedir :



Asetaldehitin asetik asite çevrilerek ortamdan uzaklaştırılmasında görev alan enzim ise aldehit dehidrogenazdır ve koenzim olarak NAD^+ gerektirir (aldehit : NAD^+ oksidoredüktaz, EC. 1.2.1.3; ALDH). Aldehit dehidrogenaz aşağıda gösterilen reaksiyonu katalize etmektedir :



Alkolün organizmada meydana getirdiği zararlı etkilerinde asetaldehitin rol oynaması sebebiyle, asetaldehitin ortadan kaldırılmasında rol alan aldehit dehidrogenaz enzimi ile ilgili pekçok çalışma yapılmış ve halen de yapılmaktadır. Bu çalışmalarla enzimin dokulardaki dağılımı (5,12), yapısı (11,20), izoenzim şekilleri (2,13,20), özellikleri (19,22), etki tarzı (24), katalizlediği reaksiyonlar (15,16) ve alkol metabolizmasındaki rolü aydınlatılmağa çalışılmaktadır.

* A.Ü. Tıp Fakültesi Biokimya Anabilim Dalı

Aldehit dehidrogenaz, karaciğerde etanol metabolizması sonucunda meydana gelen asetaldehitte birlikte diğer birçok aldehitin de oksidasyonunu katalize etmektedir.

ALDH in memelilerde en fazla bulunduğu yer karaciğerdir, ayrıca böbrekler, gonadlar, beyin, uterus, ince barsaklar ve kalpde de oldukça fazla miktarda bulunmaktadır (5,12). Ayrıca eritrositlerde de oldukça yüksek enzim aktivitesi tespit edilmiştir (13). Enzimin hücrelerin hem sitoplazmasında ve hem de mitokondirilerinde bulunduğu tespit edilmiştir (5,12,13).

ALDH in hücrede bulunuş yerleri farklı olan bu iki izoenzim şeklinin substratları için Km değerleri ve diğer birçok özelliklerinin de farklı olduğu görülmektedir (11,24,26).

ALDH in her iki izoenzim şeklinin de dört alt üniteden yapılmış tetramer şeklinde bulunduğu tespit edilmiştir (9,12,13,14). Değişik pH larda, metal iyonları ve diğer etkilerle tetramer, dimer şekline çevrilebilmekte ve aktivitesinde değişme olmaktadır (4,25).

Bu çalışmada insan eritrosit ALDH ı kısmen saflaştırılarak kinetik özellikleri incelenmiştir.

MATERYAL ve METOD

Kullanılan Cihazlar : Beckman UV spektrofotometresi, Sorvall santrifüj cihazı ve Pharmacia kromatografi kolonları.

Kullanılan Kimyasal Maddeler : Asetaldehit, NAD⁺, β -Merkapto-etanol ve glutasyon Merck firmasından, Sephadex G-200 Pharmacia'dan temin edilmiştir. Disülfiram ise Nobel ilaç firması tarafından imal edilen «Antabus» patent isimli ilaçtan bir seri ekstraksiyon işlemi sonunda elde edilmiştir.

Asetaldehit kullanılmadan hemen önce destillenmiş, NAD⁺ ise kullanılan tampon ile her gün taze olarak hazırlanmıştır. Disülfiram suda çözünmediği için etanolde çözülerek kullanılmıştır. Bütün deneylerdeki son etanol konsantrasyonu % 0,17 kadardır. Bu miktardaki etanolün deneyler üzerinde herhangi bir bozucu tesir göstermediği tespit edilmiştir.

Hemoglobin Tayini : Oksihemoglobin metodu ile yapılmıştır.

Protein Tayini : Biüre ve Lowry metotları ile yapılmıştır (18,23).

ALDH Aktivitesinin Tayini : pH 7.4 fosfat tamponunda ALDH katalizi ile asetaldehitten asetik asit oluşurken meydana gelen NADH nin 340 nm'deki absorbanısı ölçülerek tayin edilmiştir. NADH teşekkülü

ile meydana gelen absorbans değişimi, ALDH aktivitesi ile doğru orantılıdır (13).

Enzim çözeltisi ilave edildikten sonra 340 nm de köre karşı absorpsiyonda meydana gelen değişimler kaydedilmiştir. Bütün deneyler 25°C da yapılmıştır.

Aktivite Birimi : Aktivite dakikada meydana gelen absorbans değişimi olarak tesbit edilmiş ($\Delta E./dak$), bu değer 4823* ile çarpılarak internasyonel ünite (IU) cinsinden hesaplanmıştır. Sonuçlar (IU/mg Hb) olarak ifade edilmiştir.

ALDH nın Eritrositlerden İzolasyonu :

Deneylerimizde sağlıklı şahıslardan elde edilen eritrositleri kullandık. Alınan kanlar sitratlı tüplere konulmuş ve 3000 g de 5 dakika santrifüjlenerek üstte kalan plazma ve lökosit tabakası çekilerek atılmıştır. Tüpün dibinde kalan eritrosit sedimenti izotonik sodyum klörür çözeltisi ile 3 defa yıkanmıştır. Bu sediment 50 mM pH 7.4 fosfat tamponu ile 1/10 oranında seyreltilmiş ve elde edilen hemolizat 20000 xg de 30 dakika santrifüjlenmiştir. Bu süpernatandan 5 ml alınarak oda sıcaklığında, 2,5 x 20 cm boyutlarındaki kolona tatbik edilmiştir. Kolonda 50 mM, pH 7,4 fosfat tamponu ile dengelenmiş Sephadex G-200 jeli bulunmaktadır (deneylerde kullanılan tamponların hepsi % 0,05 V/V β -markaptoetanol ve 0,5 mM EDTA ihtiva etmektedir). Kolondan alınan her fraksiyonda protein ve ALDH aktivitesi tayin edilerek yüksek aktivite ihtiva eden fraksiyonlar birleştirilmiştir. Her nümune için bu işlem ayrı ayrı yapılmıştır. Aktivite ihtiva eden son elüat hacimleri 5-8 ml kadardır. Bu kısım deneylerde enzim çözeltisi olarak kullanılmıştır.

$$* \text{ I.U. } (\mu \text{ mol/dak}) = (\Delta E./\text{dak}) \times 10^6 = \frac{1}{\epsilon l} \times \frac{\text{Son Hacim}}{\text{Nümune Hacmi}}$$

ϵ : NADH'nın 340 nm'deki molar absorpsiyon kat sayısı = 6220 m⁻¹ (13)
l : Küvet genişliği (ışık yolu, lcm)

Son hacim burada 3 ml, Nümune hacmi (enzim çözeltisi) 0,1 ml'dir.

$$\text{I.U. } (\mu \text{ mol/dak}) = \frac{10^6}{6220 \times l} \times \frac{3}{0,1} \times (\Delta E./\text{dak}) = (\Delta E./\text{dak}) \times 4823.$$

SONUÇLAR

Kısmen saflaştırılmış eritrosit ALDH enzimi ile yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir.

1 — Enzim Aktivitesinin Ölçülmesi : Enzim aktivitesinin ölçülmesi için kullanılan reaksiyon şeması aşağıda gösterilmiştir (Tablo 1).

Tablo 1 : ALDH aktivitesi tayin şeması

Reaktifler	Kör	Numune
Fosfat tamponu (50 mM, pH 7.4)	1.7 ml	1.6 ml
NAD (3mM)	1.0 ml	1.0 ml
Asetaldehit (100 mM)	0.3 ml	0.3 ml
Enzim çözeltisi	—	0.1 ml

Yukarıda verilen tayin şemasına göre yapılan aktivite tayininde son elüattaki enzim aktivitesi 310 IU/mg Hb bulunmuştur.

Not : Burada verilen toplam aktivite değeri üç değerlerin ortalamasıdır.

Aynı şekilde bundan sonra verilecek olan bütün değerler en az üç tayinin ortalaması alınarak hesaplanmıştır.

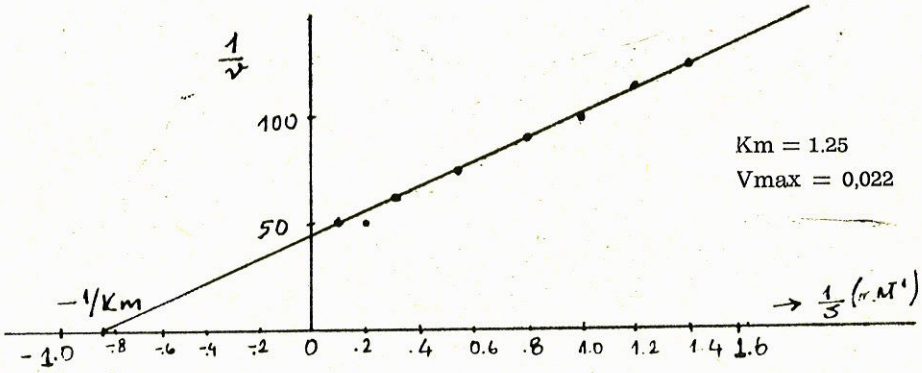
2 — Değişen asetaldehit konsantrasyonunun enzim aktivitesine etkisi :

Tablo 1 de verilen genel reaksiyon şemasına göre yapılan kinetik incelemelerde, enzimin Michaelis-Menten kinetiğine uygun davrandığı gözlenmiştir. Lineweaver-Burk grafiği ve matematiksel analiz yardımı ile enzimin asetaldehit substratına karşı K_m si 1.25 mM ve V_{max} 0.022 bulunmuştur (Şekil 1).

3 — DL - Gliseraldehitin ALDH aktivitesi üzerine etkisi : Yukarıdaki şekilde hesaplanan K_m değeri 0.25 mM ve V_{max} değeri 0.01 olarak bulunmuştur (Şekil 2).

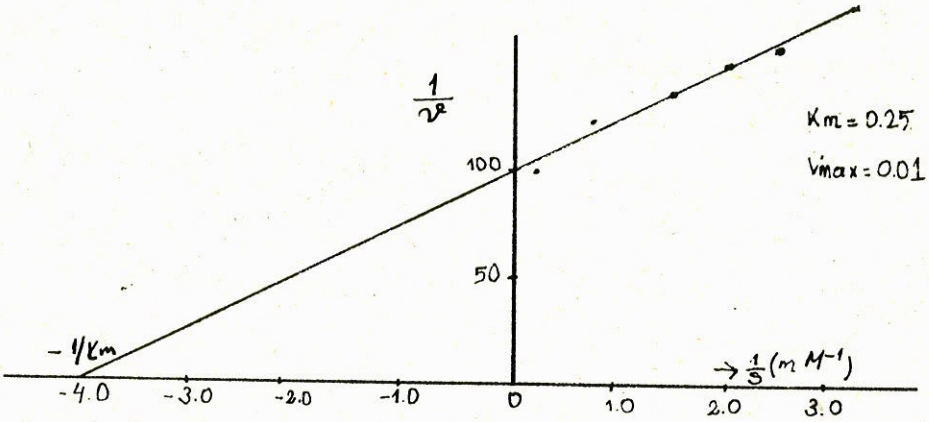
4 — NAD^+ 'nin ALDH aktivitesi üzerine etkisi : Aynı şekilde hesaplama ile K_m değeri 0.02 mM ve V_{max} değeri 0.033 olarak bulunmuştur (Şekil 3).

5 — ALDH aktivitesi üzerine disülfiramın etkisi : Tablo 1 de verilen reaksiyon şartlarında, ortamda 10 μ M konsantrasyonda disülfiram bulunduğu zaman şekil 4 de görüldüğü gibi büyük bir inhibisyon oluşmuştur. Bu inhibisyonun unkompetetif tipte olduğu görülmektedir. Bu şartlarda K_m değeri 0.5 mM ve V_{max} değeri 0.01 olarak bulunmuştur (Şekil 4).



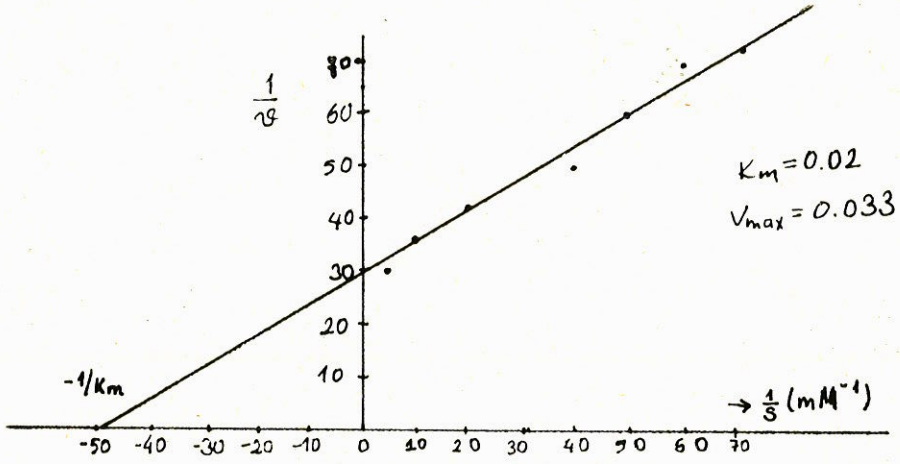
Şekil-1. Değişen asetaldehit konsantrasyonunun ALDH aktivitesine etkisi (Lineweaver-Burk grafiği)

6 — a) ALDH-Disülfiram reaksiyonu üzerine β -Merkaptoetanölün etkisi : 10 μ M son konsantrasyondaki disülfiramın meydana getirdiği inhibisyon (yaklaşık % 50) ortamda 1mM konsantrasyonda β -Merkaptoetanölün olması ile tamamen ortadan kalkmıştır.



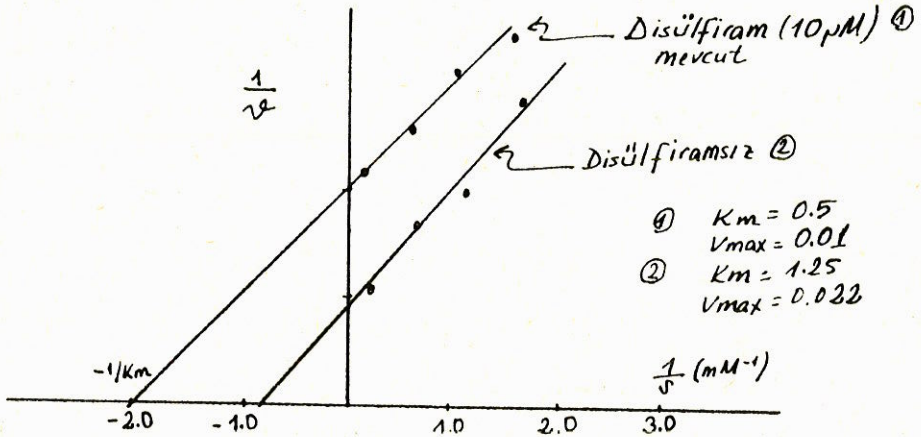
Şekil-2. Değişen DL-gliseraldehit konsantrasyonunun ALDH aktivitesine etkisi (Lineweaver-Burk grafiği)

b) ALDH-Disülfiram reaksiyonu üzerine indirgenmiş glutatyonun (GSH) etkisi : 10 μ M son konsantrasyondaki disülfiramın meydana getirdiği inhibisyonunda, ortamda 1mM GSH'nin olması ile herhangi bir değişiklik olmamıştır. Yani, glutatyon disülfiramın sebep olduğu inhibisyonu kaldıramamıştır.



Şekil-3. Değişen NAD^+ konsantrasyonunun ALDH aktivitesine etkisi (Lineweaver-Burk grafiği)

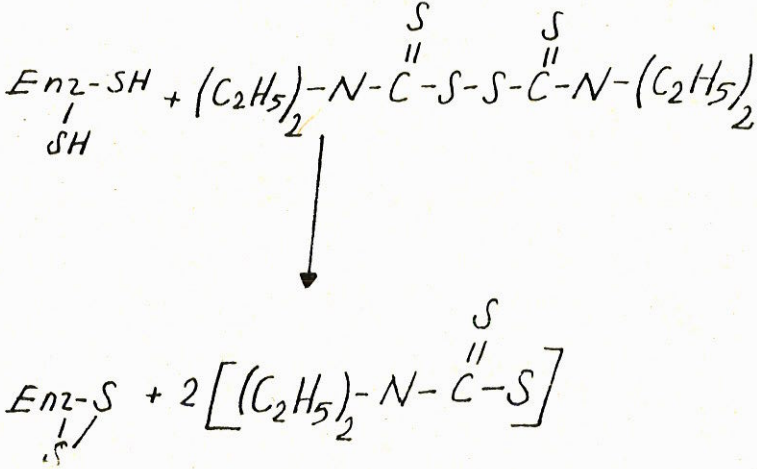
7 — ALDH aktivitesi üzerine Mg^{+2} , Ca^{+2} ve Hg^{+2} nin etkileri : 1.5 mM son konsantrasyondaki Mg^{+2} ve Ca^{+2} sırası ile % 85.16 ve % 94.84 lük bir aktivite artışına sebep olurken aynı miktar Hg^{+2} enzim aktivitesini % 90.32 inhibe etmiştir.



Şekil-4. 10 μM Disulfiramın mevcut olduğu şartlarda değişen asetaldehit konsantrasyonunun ALDH aktivitesine etkisi (Lineweaver-Burk grafiği)

$\frac{1}{S}$ Asetaldehit

lazmik enzim ile yakınlık göstermektedir (30). Disülfiramın etkisini enzim üzerinde S-S köprüleri oluşturarak yaptığı sanılmaktadır (6). Muhtemel mekanizma aşağıdaki şekildedir.



Buna karşılık disülfiram, —SH grubu ihtiva eden diğer bazı enzimler üzerinde her hangi bir etkiye sahip değildir (29,30). Bundan dolayı disülfiram —ALDH reaksiyonu, —SH grubu inhibisyonuna dayanan genel inhibisyon tarzından farklılıklar göstermektedir. Bunun sebebi tam olarak anlaşılammıştır. Bu bakımdan disülfiram-ALDH reaksiyonu üzerine β -Merkaptoetanol ve GSH'nın etkilerinin araştırılmasını faydalı gördük. Bilindiği gibi her iki bileşik de S-S köprülerinin redüklenmesini sağlar. Fizyolojik şartlarda, glutasyon bu bakımdan oldukça önemlidir. β -Merkaptoetanolün disülfiram tarafından inhibe edilen enzime tekrar aktivite kazandırmasına karşılık, glutasyonun etkili olamaması oldukça önemli sonuçlara sebep olmaktadır. Bu bakımdan elde ettiğimiz neticeler disülfiram tedavisi gören kişilerdeki durum ile de uygunluk göstermektedir. Disülfiram tedavisi sonucu insan eritrosit ALDH aktivitesinin tamamen kaybolduğu ve yeni eritrositler dolaşıma verilinceye kadar aktiviteye rastlanmadığı bilinmektedir (6,27). Fizyolojik şartlarda ortaya çıktığı belirtilen bu durum, bu çalışmada da teyit edilmiştir. β -Merkaptoetanolün inhibisyonu kaldırmasına karşılık glutasyonun etkili olamayışı hakkında değişik hipotezler mevcuttur. Bunlardan birisi, GSH'nın asetaldehit ile birleşerek hemiasetaller oluşturduğunu ve bu şekilde inhibisyonu kaldıramadığını ileri sürmektedir (30).

Eritrosit enzimi ile sitoplazmik enzim arasındaki bir diğer benzerlik her iki enzimin de 2 değerli bazı metaller tarafından aktive edilmesidir. Bu çalışmada Mg^{+2} ve Ca^{+2} nin enzim aktivitesini yaklaşık iki kat arttırdığı gözlenmiştir. Bu durum karaciğer sitoplazmik ALDH sı için de geçerlidir (4,24). Bu sonuçlar tetramer şeklinde etki eden enzimin bu metallerin etkisi ile dimer şekle çevrildiği görüşünü kuvvetlendirmektedir (4,24). Benzer bir dönüşme pH nin 7.0 den 9.0 a çıkarılması ile de gözlenmiştir (24). Bu metal iyonlarının etkilerini nasıl bir konformasyon değişikliği ile oluşturduğu henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Buna karşılık, ağır bir metal olan Hg^{+2} nin enzimi inhibe edişi muhtemelen enzimin yapısındaki —SH grupları ile irreversibl etkileşmesi sonucu meydana gelmiş olabilir. Bilindiği gibi bu tür ağır metal katyonları proteinleri denatüre edebilmektedir. Hg^{+2} nin etkisinin EDTA ilavesi ile ortadan kaldırılamaması Hg^{+2} -enzim etkileşmesinin irreversibl karakterini yansıtmaktadır. Buna karşılık EDTA, Mg^{+2} ve Ca^{+2} ile kuvvetli kelatlar teşkil edebildiği için bu katyonları ortamdan uzaklaştırmakta ve neticede metal etkisi ile dimerik şekle dönüşmüş olan enzim tekrar tetramer şekle çevrilmektedir. Bu da tabii olarak enzim aktivitesinin tekrar eski duruma gelmesine sebep olmaktadır.

ÖZET

İnsan eritrosit aldehit dehidrogenazı kısmen saflaştırılarak kinetik özellikleri incelendi. Enzimin kullanılan substratlarla Michaelis-Menten kinetiğine uygun davrandığı tespit edildi. 10 μ M disülfiram ile enzim aktivitesinde yaklaşık % 50 inhibisyon meydana geldi. 1 mM β -merkaptotanol ilavesi ile bu inhibisyon tamamen ortadan kalktığı halde redüklenmiş glutatyonun etkisi olmadı. 1,5 mM Mg^{+2} ve Ca^{+2} un enzim aktivitesinde sırasıyla % 45,16 ve % 54,84 aktivasyona yol açtığı görüldü. 1,5 mM Hg^{+2} ise yaklaşık % 90,32 inhibisyona sebep oldu. Metal iyonlarının meydana getirdiği aktivasyon EDTA ilavesiyle tamamen ortadan kalktı, Hg^{+2} nin yaptığı inhibisyon üzerinde ise EDTA nin herhangi bir etkisi tespit edilemedi.

Neticede bu kinetik özellikleri ile eritrosit enziminin, sitoplazmik karaciğer enzimi ile büyük benzerlikler gösterdiği müşahade edildi.

SUMMARY

Partial purification of human erythrocyte aldehyde dehydrogenase and investigation of its kinetic properties

Human erythrocyte aldehyde dehydrogenase was partly purified and its kinetic properties were investigated. Enzyme showed normal Michaelis-Menten kinetics with used substrates. 10 μ M disulfiram inhibited enzyme activity by 50 %. When 1 mM β -mercaptoethanol was added, this inhibition was removed, but reduced glutathion did not cause any effects. 1,5 mM Mg^{+2} and Ca^{+2} increased the enzyme activity 45,16 % and 54,84 % respectively. But, 1,5 mM Hg^{+2} caused about 90,32 % inhibition. These activations produced by metal ions were totally removed with EDTA, but EDTA caused no effects on Hg^{+2} inhibition.

As a result, it was seen that the kinetic properties of erythrocyte enzyme were very similar to the liver cytoplasmic enzyme.

KAYNAKLAR

1. Agarwal, D.P. : Comparative study of erythrocyte ALDH in alcoholics and control subjects. *Pharmacology Biochemistry and Behaviour*. 18 (Suppl. 1), 89-95, 1983.
2. Agnew, E.M. et al. : A reinvestigation of purity isoelectric points and some kinetic properties of ALDH from sheep liver. *Eur. J. Biochem.*, 119, 79-84, 1981.
3. Amir, S. et al. : The role of acetaldehyde in the psychopharmacological effects of ethanol in : Rigter, H. and Crabbe, J.C. (eds.) *Alcohol tolerance and dependence*. Elsevier, N.H., Biomedical Press, 317-377, 1980.
4. Benett, A.F. et al. : Inhibition of the dehydrogenase activity of sheep liver cytoplasmic ALDH by magnesium ions. *Biochemistry* 22, 776, 1983.
5. Deitrich, R.A. : Tissue and subcellular distribution of mammalian aldehyde oxidizing capacity. *Biochem. Pharmacology*. 15. 1911, 1966.
6. Durak, İ., Gökhan, İ.H. : Normal şahıslarda ve disulfiram tedavisi gören alkoliklerde disulfiram-eritrosit aldehit dehidrogenaz reaksiyonu üzerine β -merkaptetanolün tesirleri. *Doğa, Tu Tıp ve Ecz. D.* 11, 1, 38-42, 1987.
7. Durak, İ., Gökhan, İ.H. : Sığır karaciğer sitoplazmik aldehit dehidrogenazının saflaştırılması, kinetik özellikleri ile disulfiram tarafından inhibisyonun araştırılması. *A.Ü. Tıp Fak. Mec.* 1,40,49-60, 1987.

8. Eriksson, C.J.P. : The role of acetaldehyde in drinking behaviour and tissue damage. *British J. on Alcohol and Alcoholism*, 17,2,57-69, 1981.
9. Gibbon, M. et al. : Purification and properties of sheep liver ALDH. *Eur. J. Biochem.*, 96 585-595, 1979.
10. Hellstrom, E. and Tottmar, O. : Effects of ALDH inhibitors on enzymes involved in the metabolism of biogenic aldehydes in rat liver and brain. *Biochem. Pharmacology*, 31,3895-3905, 1982.
11. Hempel, J. et al. : Structural relationships among ALDH. *Pharmacology Biochemistry and Behaviour*. 10, Suppl. 117-121, 1983.
12. Inoue, K. and Lindros, O.K. : Subcellular distribution of human brain ALDH. *J. of Neurochem*, 38,884-888, 1982.
13. Inoue, K. et al. : Purification and partial characterization of ALDH from human erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 569,117-123, 1979.
14. Leicht, W., Heinz, F., and Freimüller, F. : Purification and characterization of ALDH from bovine liver. *Eur. J. Biochem*. 83,189-196, 1978.
15. Li, T.K. : Enzymology of human alcohol metabolism. *Adv. Enzymol*. 46,427-483, 1977.
16. Lieber, C.S. : Metabolism of ethanol. In : *Metabolic aspects of alcoholism*, edited by Lieber, C.S., University Park Press, Baltimore, 1977.
17. Lieber, C.S., and Decarli, : Hepatic ethanol oxidizing system in vitro characteristics and adaptive properties in vivo. *J. Biol. Chem*. 245,2505-2512, 1970.
18. Lowry, O.H. et al. : Protein measurement with the Folin reagent. *J. Biol. Chem*. 193,265-275, 1951.
19. Petterson, H., and Tottmar, O. : Aldehyde dehydrogenases in rat brain, subcellular distribution and properties. *J. Neurochem.*, 38,477-487, 1982.
20. Pietruszko, R. : Aldehyde dehydrogenase isoenzymes. *Current topics in biological and medical research*. Vol : 8, Cellular localization, metabolism and physiology, 195-217, 1983.
21. Pietruszko, R., Hempel, J.D., and Vallari, R.C. : Chemical modification and site of interaction of human aldehyde dehydrogenase with disulfiram and iodoacetamide. *Enzymology of carbonyl metabolism*, 61-75, 1982.
22. Pietruszko, R. et al. : Kinetic mechanism of human cytoplasmic ALDH₁. *Arch. Biochem. Biophys*. 212,9-19, 1981.

23. Richerich, R. : Protein bestimmung durch biüret methode. Klinische Chemie. S. Karger Verlag, Basel, 1978.
24. Takahashi, K., Weiner, H., and Filmer, D.L. : Effects of pH on horse liver ALDH. Alterations in metal ion activation, number of functioning active sites, and hydrolysis of the acyl intermediate. *Biochemistry*, 20,6225-6230, 1981.
25. Takahashi, K., Weiner, H., and Hu, J.H.J. : Increase in the stoichiometry of functioning active sites of horse liver ALDH in the presence of Mg^{++} ions. *Arch. Biochem. Biophys.*, 205,571-578, 1980.
26. Tottmar, S.O.C. et al. : The subcellular distribution and properties of ALDH in rat liver. *Biochem. J.* 135,577-586, 1973.
27. Towell, J.F. et al. : Disulfiram and erythrocyte ALDH inhibition. *Clinical Pharmacology Therapeutics*. 34(4), 517-521, 1983.
28. Towell, J.F. et al. : Erythrocyte aldehyde dehydrogenase : Assay of a potent biochemical marker of alcohol abuse. *Clin. Chem.* 32/5, 734-738, 1986.
29. Vallari, R., and Pietruszko, R. : Human aldehyde dehydrogenase. Mechanism of inhibition by disulfiram. *Science*, 216, 1982.
30. Vallari, R.C., and Pietruszko, R. : interaction of human cytoplasmic ALDH₂ with disulfiram. *Pharmacology Biochem. and Behaviour*, 18, (Suppl-1), 425-428, 1983.