

SİĞİR KARACİĞER SİTOPLAZMİK ALDEHİT DEHİDROGENAZ (ALDH₂) ENZİMİNİN SAFLAŞTIRILMASI, KİNETİK ÖZELLİKLERİ İLE DİSULFİRAM TARAFINDAN İNHİBİSYONUN ARAŞTIRILMASI

İlker Durak*

İsmail H. Gökhan**

Çeşitli türlerden aldehit dehidrogenaz enzimi saflaştırılarak kinetik özellikleri incelenmiş, enzimin yapı ve fonksiyon bakımından türlere bağlı özellikleri tespit edilerek alkolik tipin ortaya çıkmasında hangi şekilde fonksiyon gördüğü araştırılmaya başlanmıştır. Neticede enzimin mitokondriyal formunun genetik olarak eksik olması sebebi ile bazı Uzak Doğu Toplumlarında görülen alkol içememe olayının etiyolojisi aydınlatılmıştır (14). Ayrıca alkoliklerin tedavisinde yaygın olarak kullanılan disulfiramın, etkisini aldehit dehidrogenaz enzimini inhibe ederek meydana getirdiği tespit edilmiş ve disulfiram-aldehit dehidrogenaz reaksiyonunun tabiatı araştırılmaya başlanmıştır (13). Bu bakımdan aldehit dehidrogenaz enzimi üzerinde yapılan kinetik ve diğer çalışmalar önem kazanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Bu çalışmada sığır karaciğeri materyal olarak kullanılmıştır.

Cihazlar : Beckman UV-Visible Model 25 Spektrofotometresi, Sorvall Santrifüjü, Waring Blendör, Kromatografi kolonları ve diğer laboratuvar malzemeleri.

Kimyasal Maddeler : Asetaldehit, NADH₂, hidroksilamin hidroklorür, merkaptotanol, sodyum piruvat, glutamat Merck firmasının.

* A. Ü. Tıp Fak. Biyokimya Anabilim Dalı, Öğ. Üyesi

** A. Ü. Tıp Fak. Biyokimya Anabilim Dalı, Öğ. Üyesi

Not : Bu çalışma araştırmacının (İlker Durak) Doktora Tez çalışmasından bir bölümü ihtiva etmektedir.

dan; sephadex-G 200 filtrasyon jeli ve diğer kimyasal maddeler Pharmacia ve Sigma firmalarından temin edilmiştir. Disulfiram, Antabus isimli ilaçtan bir seri ekstraksiyon tekniği ile elde edildikten sonra saflığı kontrol edilmiş, erime noktası 68-71 °C aralığında, kloroformdaki % 5 lik çözeltisinin 17°C deki kırma indisi $n=1.4610$ bulunmuştur.

Kinetik çalışmalarda kullanılan tamponlar ortamda bulunması muhtemel Alkol Dehidrogenaz enzimini inhibe etmek için 0.5 mM hidroksilamin ihtiva etmektedir. Asetaldehit polimerizasyona olan meyilden dolayı kullanılmadan hemen önce distillenmiş ve istenilen konsantrasyonlarda seyreltmeler yapılarak kullanılmıştır. NAD ve NADH₂ her gün taze olarak hazırlanmıştır. Disulfiram suda çözünmediği için etanolde çözülerek kullanılmıştır. Bütün deneylerde kullanılan etanolün son konsantrasyonu % 0.17 kadar olup bu miktarın deneyler üzerinde herhangi bozucu bir tesire sahip olmadığı tespit edilmiştir (8).

Metot : Total protein tayini Biüre ve Lowry metotlarına göre yapılmıştır (3,10).

Aldehit Dehidrogenaz aktivitesi tayini aşağıdaki reaksiyon sonucu teşekkül NADH nin 340 nm deki absorpsiyon değişmesinden yararlanarak tayin edilmiştir.

Asetaldehit + NAD⁺ $\xrightarrow{\text{Laktat Dehidrogenaz (LDH) ve Glutamat Dehidrogenaz (GLDH)}}$ Asetikasit + NADH + H⁺
Laktat Dehidrogenaz (LDH) ve Glutamat Dehidrogenaz (GLDH) aktivite tayinleri klasik metotlar ile yapılmıştır (2). Grafiklerde yatay eksene substrat konsantrasyonu (μM veya mM olarak, dikey eksene ise dakikadaki optik dansite değişimlerinden ($\Delta\text{OD}/\text{dk}$) yararlanarak tespit edilen (v) değerleri yerleştirilmiştir. Kromatografik işlemler ile yapılan saflaştırma basamaklarında ise aktivite internasyonal ünite olarak (IU) ifade edilmiştir $\text{IU}/\text{L} = (\Delta\text{OD}/\text{dk}) \times 4823^{(*)}$.

Saflaştırma İşlemi :

Siğir karaciğeri hayvan kesildikten hemen sonra tuz-buz karışımına alınarak deneylerin yapıldığı soğuk odaya (0-4 °C) getirilmiştir. Karaciğer, zar, bağ ve yağ dokusu gibi kısımlarından ayıklanmış ve küçük parçalar halinde kesilmiştir. Daha sonra bu parçalardan 80 gr. alınarak 0.0025 M, pH 7.4 fosfat tamponu ile Waring Blendorda 1 dakika süre ile homojenize edilmiştir. Bu tampon 0.25 M süktroz ihtiva etmektedir.

Homojenat 500 x g de 5 dakika santrifüjlenerek hücre nükleusu ve sağlam hücreler çöktürülmüştür. Mitokondrileri uzaklaştırmak için supernatan 20.000 x g de 1 saat santrifüjlenmiştir. Mikrozomal parçacıkları uzaklaştırmak için de elde edilen supernatan tekrar 34.000 x g de 2 saat santrifüjlenmiş ve neticede sitoplazmik fraksiyonu ihtiva eden berrak supernatan elde edilmiştir. Her basamakta teşekkül eden çökelekler 0.0025 M, pH 7.4 fosfat tamponunda çözülerek daha sonraki işlemlerde kullanılmışlardır. Bir önceki basamakta elde edilen sitoplazmik supernatan amonyum sülfat ile % 45 doygunluğa getirilmiş ve 20.000 x g de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Supernatan tekrar amonyum sulfat ilavesi ile % 70 doygunluğa getirilmiş ve 20.000 x g de santrifüjlenerek aralarında aldehit dehidrogenazın da bulunduğu belirli molekül ağırlığına sahip moleküller çöktürülmüştür. Elde edilen sediment 0.050 M pH 7.4 fosfat tamponunda çözülmüş ve aynı tampona karşı 72 saat dialize tabi tutulmuştur. Dializ süresince tampon çözelti 3 defa değiştirilmiştir. Dializden sonra görülen bulanıklık santrifüjleme ile giderilmiş ve elde edilen çözeltiden 15 ml alınarak 1.5 x 100 cm boyutlarındaki kolona aşağıda anlatıldığı gibi uygulanmıştır (4).

Saflaştırma işlemi boyunca kullanılan bütün tamponlar 1 mM EDTA ve % 0.1 merkaptotanol ihtiva etmektedir. Tüm saflaştırma işlemleri 0-4 °C de yapılmıştır.

Kromatografik işlemler şu şekilde yapılmıştır : Sephadex G-200 dekstran jeli su tutma kapasitesi (yaklaşık 20 g su/g jel) ve son hacim (30-40 ml su/g jel) hesaplanarak bir su banyosu üzerinde 5 saat kaynatılmıştır. Kaynatma sırasında jel ara sıra karıştırılmış ancak jel taneciklerinin parçalanmasına sebebiyet verebilecek şekildeki bir karıştırmadan sakınılmıştır. Jel oda sıcaklığına geldikten sonra, hava karcığı kalmayacak şekilde kolona doldurulmuştur. Kolona 0.050 M, pH 7.4 fosfat tamponu tatbik edilmiş ve kararlı duruma erişmek için bu işleme 24 saat devam edilmiştir. Daha sonra kolonun üst kapağı açılarak 15 ml dializat, tampon ve jel arasına enjekte edilmiş ve kapak kapatılarak tekrar tampon tatbik edilmiştir. Kolondan çıkan her fraksiyonda protein tayini yapılmış ve protein ihtiva eden fraksiyonların herbirinde de enzim aktivitesi tayin edilerek yüksek aktivite içeren fraksiyonlar birleştirilmiştir. Kinetik çalışmalar da bu kısım enzim çözeltisi olarak kullanılmıştır (4).

SONUÇLAR

Kromatografi işlemlerinde 6 ml/saat'lik bir akış hızı ayarlanmıştır. Sitoplazmik enzim eluatında 22-188. fraksiyonlar arasında protein ve 40-81. fraksiyonlar arasında ise enzim aktivitesi tespit edilmiş ve yüksek aktivite ihtiva eden 52-66. fraksiyonları birleştirilerek (yaklaşık 15 ml) deneylerde enzim çözeltisi olarak kullanılmıştır.

Tablo 1 : Laktat Dehidrogenaz ve Glutamat Dehidrogenazın değişik fraksiyonlardaki aktivite değerleri

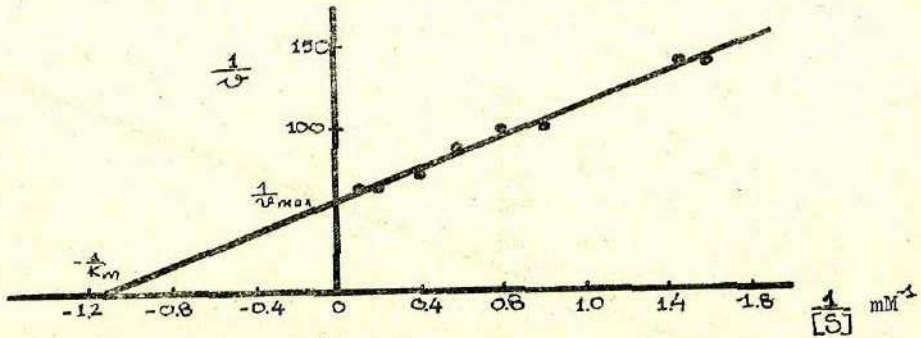
	LDH akt. $\Delta OD/dk.$	GLDH akt. $\Delta OD/dk.$
Homojenat	0.380	0.0050
500 x 9 sedimenti	0.228	0.0076
20.000 x g sedimenti	0.008	0.0150
34.000 x g sedimenti	0.005	0.0013
Supernatan	0.400	0.0006

Tablo 1'deki değerlerden de görüldüğü gibi, sitoplazmik bir enzim olan LDH'nin aktivitesi sitoplazmik supernatanda en yüksek seviyededir. Buna karşılık mitokondriyal bir enzim olan GLDH'nin aktivitesi ise 20.000 x g deki fraksiyonda en yüksek değerdedir. Bu durum sitoplazmik ve mitokondriyal fraksiyonların santrifüleme işlemi ile istenilen şekilde ayrıldığını göstermektedir. Her bir fraksiyondaki ALDH₂ aktivitesi ise aşağıdaki gibidir.

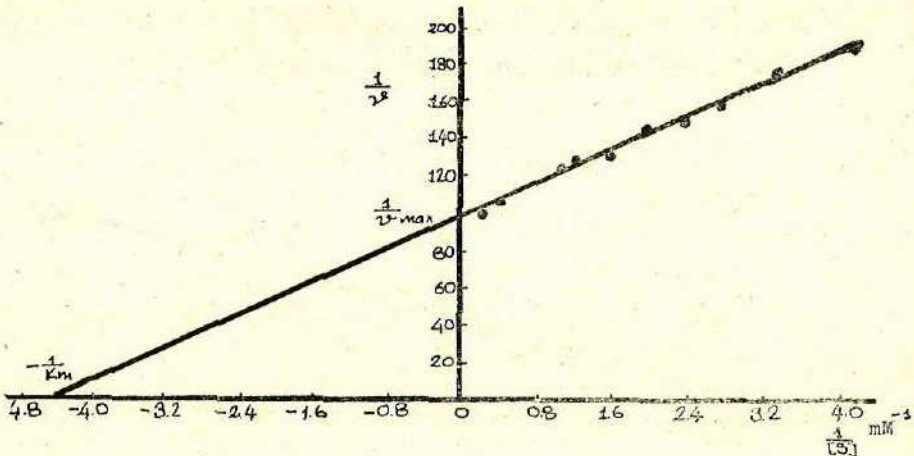
Tablo 2 : Değişik Saffaştırma basamaklarında ALDH₂ aktivite değerleri

	Protein mg/ml	Aktivite IU/L	Sp. Akt. IU/L mg
Homojenat	24.2	120.57	4.980
Supernatan	20.0	115.75	5.790
Amonyum Sulfat Fraksiyonu	34.00	337.61	9.930
Dializat	32.4	327.96	10.120
Eluat	1.7	77.17	45.400

Sitoplazmik aldehit dehidrogenaz enzimi saflaştırıldıktan sonra değişik substratlarla ve çeşitli şartlar altında bir seri kinetik çalışma yapılmıştır. Biz burada fazla grafiksel şekillerin meydana getireceği karmaşıklığı önlemek için sadece Lineweaver-Burk grafiklerini vereceğiz. Tespit etmiş olduğumuz kinetik niceler ise hem Lineweaver-Burk ve hem de Michaelis Menen grafikleri ile tespit edilen değerlerdir. Ayrıca bu değerler, hesaplama yapılan değerler ile de karşılaştırılarak mümkün olduğu kadar doğruluk sağlanmaya gayret edilmiştir.

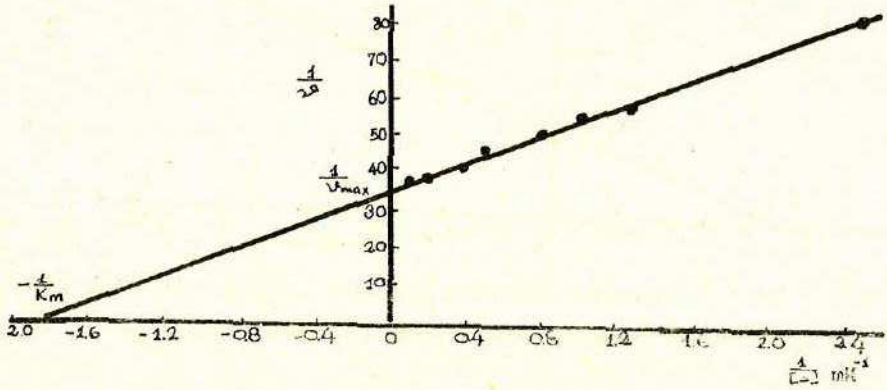


Grafik 1 : ALDH₂ nin asetaldehit substratına karşı 30 mM, pH 7.4 fosfat tamponu ve 1 mM NAD'nın bulunduğu şartlarda çizilen Lineweaver-Burk grafiği.

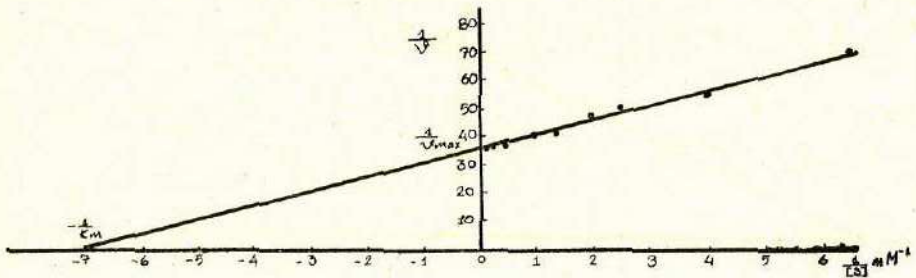


Grafik 2 : ALDH₂ nin asetaldehit substratına karşı 30 mM, pH 9.0 pirofosfat tamponu ve 1 mM NAD'nın bulunduğu şartlarda çizilen Lineweaver-Burk grafiği.

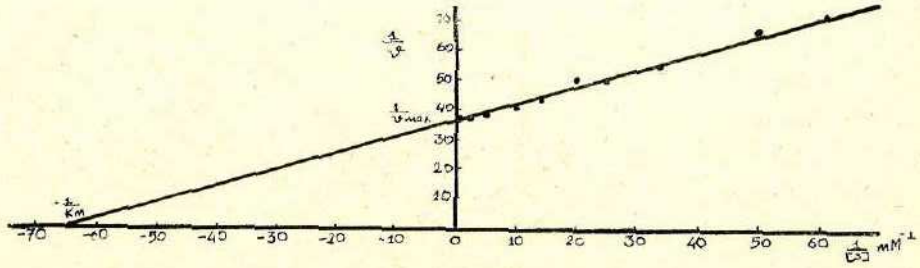
Grafik 7 den görüldüğü gibi, disulfiram NAD substratına karşı nonkompetitif bir inhibisyona sebep olurken, asetaldehit substratına karşı kısmi bir unkompetitif inhibisyon meydana getirmiştir (Grafik 6). Ortama ilave edilen disulfiramın miktarı arttıkça inhibisyon yüzdesi de artmaktadır. Ancak yüksek konsantrasyonda ilave edilen ($64 \mu\text{M}$) disulfiramın bile tam bir inhibisyona sebep olmadığı ve enzim aktivitesinin % 5 lik bir kısmının hala mevcut kaldığı gözlenmiştir (Grafik 8). Disulfiram ile ön inkübasyon çalışmalarında oda sıcaklığında (25°C) 1 saatlik ön inkübasyon yapılmıştır (Gr. 6 ve Gr. 7).



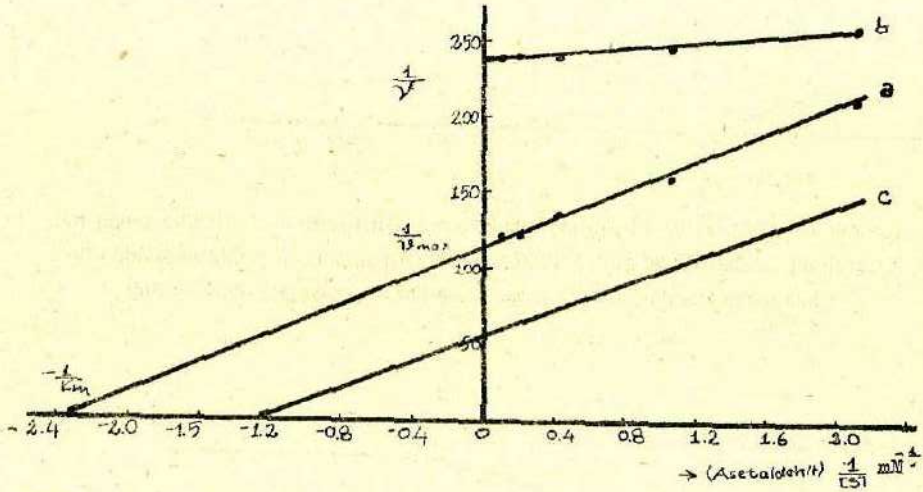
Grafik 3 : ALDH_2 nin DL-Gliseraldehit substratına karşı 30 mM, pH 7.4 fosfat tamponu ve 1 mM NAD'nın bulunduğu şartlarda çizilen Lineweaver-Burk grafiği.



Grafik 4 : ALDH_2 nin DL-Gliseraldehit substratına karşı 30 mM, pH 9.0 pirofosfat tamponu ve 1 mM NAD'nın bulunduğu şartlarda çizilen Lineweaver-Burk grafiği.



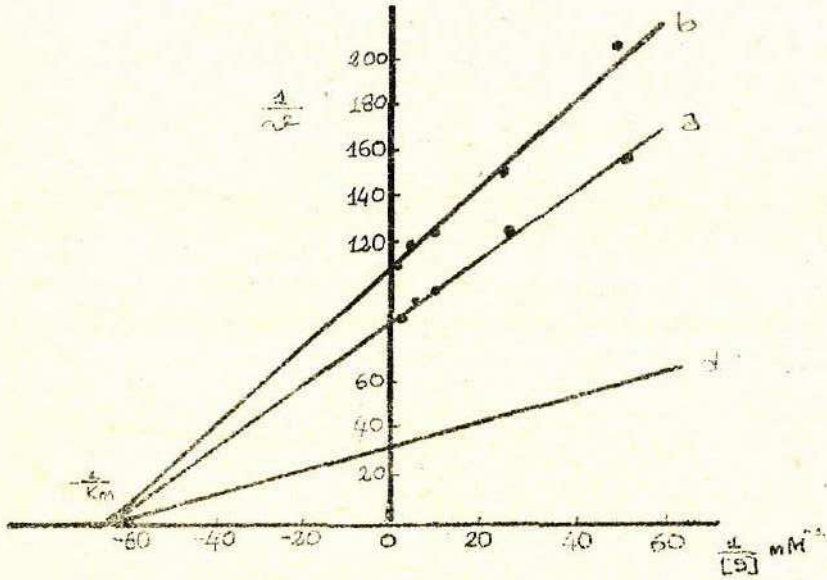
Grafik 5 : ALDH₂ nin NAD substratına karşı 30 mM, pH 9.0 pirofosfat tamponu ve 5 mM asetaldehitin bulunduğu şartlarda çizilen Lineweaver-Burk grafiği.



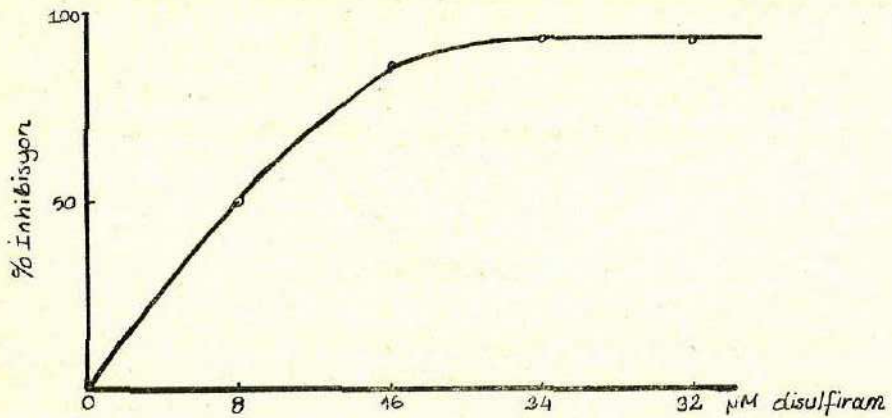
Grafik 6 : 8 μ M (a) ve 16 μ M (b) disulfiramın eşit hacmi ile ön inkübasyona tabi tutulmuş ALDH₂ nin 30 mM, pH 7.4 fosfat tamponu ve 1 mM NAD'nın bulunduğu şartlarda çizilen Lineweaver-Burk grafiği (C : Disulfiramsız).

TARTIŞMA

Etanol karaciğerde üç metabolik yol üzerinden oksidasyona uğramaktadır (11). Bunlar 1. Karaciğerde alkol ve aldehit dehidrogenaz enzimatik sistemi, 2. Endoplazmik retikulumda mikrozomal etanol oksitleyici sistem (MEOS) ve 3. Katalaz peroksidatif sistemi. Bu üç sistem etanolden asetaldehit oluşumunu katalizlerler. Meydana gelen asetaldehit ise aldehit dehidrogenaz tarafından asetik aside dönüş-



Grafik 7 : 8 μ M (a) ve 16 μ M (b) disulfiramın eşit hacmi ile ön inkübasyona tabi tutulmuş ALDH₂ nin 30 mM, pH 9,0 pirofosfat tamponu ve 5 mM asetaldehitin bulunduğu şartlarda NAD substratına karşı Lineweaver-Burk grafiği.



Grafik 8 : 30 mM, pH 7.4 fosfat tamponu, 1 mM NAD ve 5 mM asetaldehitin bulunduğu şartlarda ortama ilave edilen disulfiramın ALDH₂ aktivitesi üzerine tesirleri.

türülür. ALDH'nin mitokondriyal formunun bazı toplumlarda genetik olarak mevcut olmadığının ve bu sebeple bu kişilerin alkol kullanmadıklarının tespit edilmesi ile bu enzim üzerine yapılan çalışmalar hız kazanmıştır (7,9). Mitokondriyal ALDH'ya sahip olmayan kişiler alkol kullandıkları zaman, tıpkı disulfiram tedavisinde ortaya çıkan semptomlar gözlenmektedir (6,13).

Çalışmamızın ilk aşamasında ALDH₂'nin asetaldehit, gliseraldehit ve NAD substratlarına karşı pH 7.4 ve pH 9.0 da Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek K_m ve V_{max}^{**} değerleri tespit edilmiştir. Buna göre ALDH₂ nin asetaldehit substratına karşı pH 7.4 deki K_m 'si 0.833 mM, V_{max} 'ı 0.01667 ve pH 9.0 da K_m 'si 0.556 mM, V_{max} 'ı 0.0285 olarak hesaplanmıştır. DL-Gliseraldehit substratına karşı K_m 'si pH 7.4 de 0.227 mM ve V_{max} 'ı 0.010 ve pH 9.0 da K_m 'si 0.154 mM, V_{max} 'ı 0.0276 olarak, NAD substratına karşı pH 9.0 da K_m 'si 0.0154 mM, V_{max} 'ı ise 0.0282 olarak hesaplanmıştır. Bütün substratlar için ALDH₂ nin pH 9.0 daki aktivitesinin pH 7.4 dekine nazaran yaklaşık iki kat daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Aktivitede meydana gelen bu artış, pH 7.4 de tetramer olarak çalışan enzimin pH 9.0 da dimer olarak aktivite gösterdiği düşüncesi ile açıklanmaktadır (1).

Çalışmamızın ikinci aşamasında disulfiram ile ön inkübasyona tabi tutulmuş olan ALDH₂ nin pH 7.4 de asetaldehit ve NAD substratlarına karşı grafikleri çizilmiş, K_m ve V_{max} değerleri hesaplanmıştır. 8 μ M disulfiramın eşit hacmi ile 1 saat ön inkübasyona tabi tutulmuş olan ALDH₂ nin asetaldehit substratına karşı K_m 'si 0.455 mM, V_{max} 'ı 0.00862 olarak, NAD substratına karşı K_m 'si 0.0154 mM ve V_{max} 'ı 0.0111 olarak tespit edilmiştir. 16 μ M disulfiramın eşit hacmi ile ön inkübasyona tabi tutulmuş olan ALDH₂ nin asetaldehit substratı ile olan V_{max} 'ı 0.0042, NAD'ye karşı K_m 'si 0.0154 mM ve V_{max} 'ı 0.0091 olarak tespit edilmiştir. Bu şartlarda ALDH₂'nin asetaldehite karşı tespit edilen K_m 'si çok yüksek bulunmuştur.

ALDH₂'nin son elüattaki konsantrasyonu yaklaşık olarak 8 μ M hesaplanarak, 8 μ M, 16 μ M, 24 μ M, ve 32 μ M konsantrasyonlarında disulfiramın mevcut olduğu şartlardan aktivite tayini yapılmıştır. Gra-

* 4823 : NADH için ekstinksiyon katsayısı 6.22×10^4 (12), kuvvet genişliği 1 cm. kullanılan enzim çözeltisi hacmi 0.1 ml ve son hacim 3.0 ml alınarak hesap ile çıkarılmıştır.

** V_{max} değerleri $\Delta OD/dk$ olarak ifade edilmiştir.

fik 8 den de görüldüğü gibi, yüksek disulfiram konsantrasyonlarında bile enzim aktivitesinin % 5 lik bir kısmı hala muhafaza edilmektedir. Disulfiramın, alkol metabolizmasını asetaldehit basamağında inhibe ederek asetaldehit konsantrasyonunun yükselmesine sebep olduğu ve bu durumun baş dönmesi, mide bulantısı, kusma, yüzde kızarma gibi durumların ortaya çıkmasında esas faktör olduğu bilinmektedir (5). ALDH-Disulfiram reaksiyonunun tabiatı henüz tam olarak bilinmemektedir. Son zamanlarda kabul edilen bir tesir mekanizması, disulfiramın tesirini enzim proteini yapısında bulunan —SH grupları arasında disülfid (S—S) köprüleri oluşturarak gösterdiği şeklindedir (13). Konu üzerindeki çalışmalar devam etmektedir.

ÖZET

Aldehit dehidrogenaz (Aldehit oksidoredüktaz E.C. 1.2.1.3) alkol metabolizması sonucu teşekkül eden asetaldehit ile birlikte bir çok aldehit yapısına sahip maddenin oksidasyonunu katalizleyen bir enzimdir. Bu enzim alkol metabolizmasında ve alkolik tipin ortaya çıkmasında önemli bir fonksiyona sahiptir. Bundan dolayı bu çalışmada sitoplazmik aldehit dehidrogenaz enzimi sığır karaciğerinden izole edilerek saflaştırılmış, değişik pH'lardaki kinetik özellikleri ile alkoliklerin tedavisinde yaygın olarak kullanılan disulfiram tarafından inhibisyonunun tabiatı araştırılmıştır. Netice olarak yüksek pH'larda enzimin daha yüksek bir aktivite gösterdiği ve disulfiramın enzim için kuvvetli inhibitör madde olduğu tespit edilmiştir.

SUMMARY

The Purification of Bovine Liver Cytoplasmic Aldehyde Dehydrogenase (ALDH₂) and the Investigation of Its Kinetic Properties and Disulfiram Inhibition

Aldehyde dehydrogenase (Aldehyde oxidoreductase E.C. 1.2.1.3.) is an enzyme that catalyses the oxidation of acetaldehyde produced by alcohol metabolism as well as other substances with aldehyde structure. This enzyme has an important function in alcohol metabolism and in occurrence of alcoholic types. In this study, therefore cytoplasmic aldehyde dehydrogenase was isolated from bovine liver

and purified : Its kinetic properties at various pHs as well as the nature of disulfiram inhibition was also investigated. As a result, it is established that the enzyme has higher activity at high pHs and disulfiram is a strong inhibitor for the enzyme.

KAYNAKLAR

1. Benett, A.F. : Inhibition of dehydrogenase activity of sheep liver cytoplasmic aldehyde dehydrogenase by magnesium ions *Biochemistry* 22 : 776-779, 1983.
2. Bergmeyer, H.U. : *Methodes of Enzymatic Analysis* : Verlag Chemie GMBH. Weinheim s. 637-638 ve 652-633, 1985.
3. Bergmeyer, H.U. : *Methoden der Enzymatischen Analyse* : Verlag Chemie Weinheim s. 184-186, 1974.
4. Crow, E., Kitson, M., Gibbon, M., Batt, D. : Intracellular localisation and properties of ALDH from sheep liver *Biochim Biophys Acta* 350, 121-128, 1974.
5. Dickinson, F.M. : The use of pH-gradient ion exchange chromatography to separate sheep liver cytoplasmic aldehyde dehydrogenase from mitochondrial enzyme contamination and observations on cytoplasmic enzyme and disulfiram *Biochem J* 199 : 573-579, 1981.
6. Eriksson, C.J.P. : The distribution and metabolism of acetaldehyde in rats during ethanol oxidation *Biochem Pharmacol* 26 : 249-252, 1977.
7. Goodde, H.W. : Pharmacogenetics of alcohol sensitivity *Phar Biochem Behav* 18 (1) : 161-166, 1983.
8. Greenfield, N.J., Pietruszko, P. : Two aldehyde dehydrogenases from human liver *Biochem Biophys Acta* 483 : 35-45, 1977.
9. Harada, S. : Blood ethanol and acetaldehyde levels in japanase alcoholics and controls *Phar Biochem Behav* 18 (1) : 139-140, 1983.
10. Hartman, L. : *Techniques Modernes de Laboratoire et Explication Fonctionnels* Tome I L'exposition Sci. Française, Paris, s. 132-136, 1971.
11. Reet, P.S.O. : The rate of ethanol elimination in fed rat liver. Cytoplasmic and mitochondrial regulating factors. *Helsingin Yliopisto S.F.* 37-57, 1979.

12. Vallari, R., Pietruzsko, P. : Kinetic mechanism of the human cytoplasmic aldehyde dehydrogenase *Arc, Biochim. Biophys.* 212 (1) : 9-19, 1981.
13. Vallari, R., Pietruzsko, P. : Human aldehyde dehydrogenase : Mechanism of inhibition by disulfiram, *Science* 216 : 637-639, 1982.
14. Von Wartburg : Polymorphism of alcohol and aldehyde dehydrogenase and their significance for acetaldehyde toxicity. *Pharm Biochem Behav* 18 (1) : 123-125, 1983.