

Received: 2006.05.02
Accepted: 2006.07.13
Published: 2006.08.03

Dehydrogenaza alkoholowa klasy III i jej rola w organizmie człowieka

Class III alcohol dehydrogenase and its role in the human body

Wojciech Jelski, Tufik Alizade Sani, Maciej Szmítkowski

Zakład Diagnostyki Biochemicznej Akademii Medycznej w Białymstoku

Streszczenie

Dehydrogenazę alkoholową (ADH) klasy III stanowi izoenzym zbudowany z dwóch podjednostek χ , kodowany przez gen *ADH5*, umiejscowiony w tkankach wszystkich narządów. Izoenzym ten ma dużą zdolność utleniania długołańcuchowych alkoholi alifatycznych, przy jednoczesnie bardzo małym powinowactwie do etanolu. Homologiczna sekwencja aminokwasowa i takie same właściwości kinetyczne wskazują, że klasa III dehydrogenazy alkoholowej i dehydrogenaza formaldehydowa są identycznymi enzymami. ADH III odgrywa ważną rolę w metabolizmie aldehydu mrówkowego w organizmie człowieka.

Słowa kluczowe:

izoenzym klasy III dehydrogenazy alkoholowej • aldehyd mrówkowy

Summary

Class III alcohol dehydrogenase is composed of two χ subunits, encoded by the *ADH5* gene and existing in all tissues examined. It possesses a great ability to metabolize long-chain alcohols, while its capacity to oxidize ethanol is very limited. The amino-acid sequence homology and identical structural and kinetic properties indicate that class III alcohol dehydrogenase and formaldehyde dehydrogenase are identical enzymes. ADH III plays a significant role in the metabolism of formaldehyde in the human body.

Key words:

class III alcohol dehydrogenase • formaldehyde

Full-text PDF:

http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_60/9547.pdf

Word count:

1637

Tables:

3

Figures:

–

References:

27

Adres autora:

dr n. med. Wojciech Jelski, Zakład Diagnostyki Biochemicznej AM, ul. Waszyngtona 15a, 15-269 Białystok;
e-mail: wjelski@amb.edu.pl

Dehydrogenaza alkoholowa (ADH, oksydoreduktaza, alkohol: NAD⁺, EC 1.1.1.1.) jest dimerem zbudowanym z dwóch podjednostek różnego typu (α , β , γ , π , χ oraz μ), z których każda składa się z 373 reszt aminokwasowych. W skład cząsteczki ADH wchodzi także jon cynku, pełniący rolę ko-faktora, w związku z czym dehydrogenaza alkoholowa jest zaliczana do metaloenzymów [14,23]. Dotychczas stwierdzono istnienie kilku izoenzymów dehydrogenazy alkoholowej podzielonych na sześć głównych klas (u człowieka wykryto pięć klas), różniących się między sobą sekwencją aminokwasów w cząsteczce, ruchliwością elektroforetyczną, właściwościami kinetycznymi i immunologicznymi, swoistością substratową oraz wrażliwością na inhibitory [1,21]. U ssaków podjednostki poszczególnych izoenzymów są kodowane przez różne geny umiejscowione na długim ramieniu chromosomu 4 [2]. *Loci* genowe *ADH1*, *ADH2* i *ADH3* kodują odpowiednio podjednostki α , β i γ , które łącząc się tworzą dimeryczne cząsteczki izoenzymów klasy I dehydrogenazy alkoholowej [14]. Szczegółowe badania wykazały, że geny *ADH2* i *ADH3* są polimorficzne, dzięki czemu kodują różne podjednostki β (β_1 , β_2 i β_3) oraz γ (γ_1 i γ_2) [16,20]. Izoenzymy klasy I ADH występują przede wszystkim w wątrobie, ale są również obecne w przewodzie pokarmowym, płucach i nerkach [18]. Klasa II dehydrogenazy alkoholowej umiejscowiona jedynie w wątrobie, jest utworzona przez izoenzymy złożone z podjednostek π , kodowane przez gen *ADH4* [22]. Izoenzym ADH III zbudowany z podjednostek χ kodowanych przez gen *ADH5*, występuje we wszystkich narządach [1,4]. Kolejną klasę izoenzymów dehydrogenazy alkoholowej (ADH IV), odpowiadającą za metabolizm etanolu w żołądku zidentyfikowano i opisano jednocześnie przez Yin i wsp. [27] oraz Moreno i Paresa [15]. Izoenzym ten kodowany przez gen *ADH7* składa się z dwóch podjednostek μ zwanych też σ . W wątrobie i w nabłonku błony śluzowej żołądka stwierdzono obecność izoenzymu klasy V ADH, który wykazuje podobieństwo rzędu 67% do klasy VI dehydrogenazy alkoholowej. ADH VI wykryto u szczurów, przede wszystkim w wątrobie i w minimalnej ilości w nerkach, ale dotychczas nie znaleziono u człowieka [7].

Dehydrogenaza alkoholowa stanowi główny enzym uczestniczący w metabolizmie alkoholu etylowego, katalizując odwracalną reakcję utleniania etanolu do aldehydu octowego. Jednak nie wszystkie izoenzymy ADH w jednakowym stopniu biorą udział w przemianach alkoholu etylowego. Dominującą rolę w tym procesie odgrywają izoenzymy klasy I i II w wątrobie oraz klasy IV w żołądku [26]. Udział klasy V i VI dehydrogenazy alkoholowej w metabolizmie alkoholu etylowego pozostaje nadal niewyjaśniony [19]. Natomiast klasa III ADH – ze względu na swoje właściwości – właściwie nie uczestniczy w oksydacji etanolu w organizmie człowieka, ale odgrywa istotną rolę w wielu przemianach innych związków [5].

CHARAKTERYSTYKA ISOENZYMU KLASY III ADH

Klasę III izoenzymów dehydrogenazy alkoholowej stanowią dimery podjednostek typu χ , z których każdy ma masę cząsteczkową około 43 kDa [25]. Gen *ADH5* kodujący ADH III jest zbudowany tak jak inne geny ADH i zawiera 9 eksonów rozdzielonych przez 8 intronów, których pozycje są takie same jak w genach *ADH1-ADH7*. Analiza składu aminokwasowego łańcuchów polipeptydowych ADH

III pozwoliła stwierdzić, że są one utworzone z 373 aminokwasów. Izoenzym ten zawiera także 4 mole Zn²⁺/mol białka. Istotnymi pozycjami w strukturze łańcucha klasy III są Cys-44 i His-66, wiążące katalityczny jon cynku. W procesie tym biorą także udział Cys-173, Glu-67 oraz cząsteczka wody [17]. Podjednostki χ mają o dwie cząsteczki tryptofanu więcej niż podjednostki tworzące inne izoenzymy. Następstwem tego jest zwiększona absorpcja przy długości fali 280 nm [12]. Ponadto większa ilość aminokwasów o charakterze kwaśnym warunkuje odmienną ruchliwość w polu elektromagnetycznym w stosunku do pozostałych izoenzymów. Różnice w budowie łańcuchów wiążą się także z częstością występowania centrum katalitycznego i miejsc wiązania koenzymu, którym jest jon cynku. Analiza sekwencji aminokwasowej monomeru χ ADH III i sekwencji podjednostek występujących w innych klasach ludzkiej ADH wskazuje na 60% podobieństwo. Kluczowe w strukturze dehydrogenaz alkoholowych miejsca wiążące jony cynku oraz obszar wiązania koenzymu są takie same lub tylko częściowo zmienione, mimo różnic w sekwencjach aminokwasowych poszczególnych typów podjednostek tworzących dimeryczną cząsteczkę enzymu [12]. Stosując technikę elektroforetyczną rozdzielono klasę III na dwie postaci anodowe χ_1 i χ_2 . Dalsze badania wykazały, że postać χ_2 o mniejszej aktywności, ma taką samą strukturę pierwszorzędową jak postać χ_1 (bardziej aktywna), ale jest mniejsza i wędruje szybciej w polu elektromagnetycznym. Z kolei stosując techniki ogniskowania izoelektrycznego wyizolowano trzy postaci różniące się punktem izoelektrycznym. Dwie postaci anodowe χ_1 i χ_2 mają pI odpowiednio w pH 6,3–6,4 oraz 5,9–6,0. Natomiast postać katodowa χ_3 ma punkt izoelektryczny w pH 5,6 [12]. Najwyższą aktywność enzymatyczną wykazuje najbardziej zasadowa główna postać χ_1 . Aktywność ta jest ponad 3 razy wyższa w porównaniu z pozostałymi postaciami. Prawdopodobnie słabsza postać χ_2 powstała w wyniku postranslacyjnej modyfikacji silniejszej podjednostki χ_1 , co zostało potwierdzone badaniami genetycznymi [21].

ADH klasy III początkowo znajdowano tylko w ludzkim mózgu i jądrach. Obecnie wiadomo, że występuje także w wątrobie i wielu innych narządach człowieka [9,10].

WŁAŚCIWOŚCI KATALITYCZNE ADH III

Właściwości katalityczne izoenzymu klasy III dehydrogenazy alkoholowej przedstawia tabela 1. W tabeli podano podstawowe cechy opisujące aktywność enzymu, takie jak stała katalityczna (k_{cat}), stała Michaelisa (K_m) wobec NAD i etanolu, stała inhibicji (K_i) dla swoistego inhibitora enzymu – 4-metylopirazolu oraz optymalna wartość pH [11].

Analizując dane można stwierdzić, że ADH III ma niewielką wartość stałej katalitycznej i bardzo dużą wartość stałej Michaelisa wobec etanolu. Izoenzym ten cechuje się więc bardzo małym powinowactwem do alkoholu etylowego i w związku z tym etanol właściwie nie jest utleniany *in vivo* przez ADH III. Podobnie jak większość izoenzymów dehydrogenazy alkoholowej, klasa III wykazuje optimum pH w środowisku zasadowym.

Poszczególne izoenzymy dehydrogenazy alkoholowej różnią się wrażliwością na swoisty inhibitor, jakim jest pirazol i jego pochodna 4-metylopirazol. ADH klasy III nie jest hamowa-

Tabela 1. Właściwości katalityczne ADH klasy III [11]

Właściwości katalityczne ADH III	
k_{cat} (1/min)	0,054
K_m NAD ($\mu\text{mol/l}$)	64
K_m etanol ($\mu\text{mol/l}$)	$>3 \times 10^6$
K_i 4 metylopirazol ($\mu\text{mol/l}$)	>12000
V_{max} ($\mu\text{mol/l} \times \text{min}^{-1}$)	?
pH optimum	10,5

Tabela 2. Wartość k_{cat}/K_m ADH III dla różnych alkoholi w pH 10,0 ($\text{min}^{-1} \times \text{M}^{-1}$) [24]

Substrat	k_{cat}/K_m
Etanol	0,018
Oktanol (alkohol kaprylowy)	1,1
12-OH-dodekanol (alkohol laurylowy)	5,3
16-OH-heksadekanol (alkohol cetylowy)	7,2

na przez ten związek nawet w stężeniu 12 mmol/l, podczas gdy np. w wypadku ADH klasy I stężeniu 4-metylopirazolu, już stężeniu około 2 $\mu\text{mol/l}$, powoduje obniżenie aktywności o ponad 90% [6]. Mechanizm inhibicyjnego działania pirazolu polega na łączeniu się atomu azotu pirazolu z miejscem wiązania cynku, pełniącym rolę kofaktora. Cynk wiąże się z enzymem w tym samym miejscu co substrat. W wyniku za-blokowania tego miejsca przez pirazol dochodzi do współzawodnictwa z etanolem w wiązaniu do kompleksu ADH-NAD. Wzrost stopnia zahamowania aktywności ADH przez 4-metylopirazol jest proporcjonalny do siły wiązania apolarnej części inhibitora do miejsca aktywnego enzymu [5]. Lepszym inhibitorem ADH klasy III jest o-fenantrolina, tworząca kompleksy z aktywnym miejscem wiązania atomu cynku, blokując w ten sposób miejsce wiązania substratów [24].

Miarą zdolności utleniania różnych alkoholi przez dehydrogenazę alkoholową jest stosunek stałej katalitycznej k_{cat} do stałej Michaelisa (K_m). Wartość k_{cat}/K_m dla izoenzymów ADH III przedstawiono w tabeli 2.

ADH klasy III wykazuje bardzo małe powinowactwo do krótkołańcuchowych alkoholi alifatycznych. Etanol lub propanol nawet w stężeniu 2 mol/l nie powodują wysycenia enzymu. Powinowactwo $\chi\chi$ -ADH do utlenianych alkoholi wzrasta wraz ze zwiększeniem długości łańcucha, zmniejsza się bowiem wartość K_m , przy nieznacznych waha-niach k_{cat} . Co najmniej 8-węglowe alkohole alifatyczne, takie jak np. alkohol kaprylowy stanowią dobre substraty dla tego izoenzymu. Wartości stałej Michaelisa ADH III dla oktanolu i 12-hydroksydodekanolu wynoszą odpowiednio 0,50 mmol/l i 0,10 mmol/l [24].

W tabeli 3 porównano zdolności ADH III do utleniania różnych alkoholi w pH 9,6 w obecności NAD o stężeniu 1,2 mmol/l przy założeniu, że zdolność oksydacji oktanolu wynosi 100%.

Tabela 3. Aktywność ADH III w stosunku do alkoholi alifatycznych [13]

Substrat (stężenie)	Aktywność (%)
n-oktanol (1mmol/l)	100
n-heptanol (1mmol/l)	67
n-hexanol (1mmol/l)	27
n-pentanol (1mmol/l)	5
n-butanol (1mmol/l)	brak aktywności
n-butanol (30 mmol/l)	0.13
n-propanol (30 mmol/l)	brak aktywności
etanol (30 mmol/l)	brak aktywności
methanol (30mmol/l)	brak aktywności
12-hydroksydodekanol (1mmol/l)	175
n-oktanol (1mmol/l) + 10 mmol/l pirazol	95
n-oktanol (1mmol/l) + 10 mmol/l GSH	113

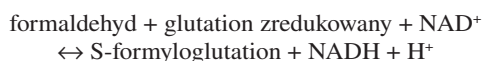
GSH – zredukowany glutation; aktywność (%) – zdolności ADH III do utleniania alkoholi w pH 9,6 w obecności NAD o stężeniu 1,2 mmol/l – przy założeniu, że zdolność oksydacji oktanolu wynosi 100%

Z przedstawionych danych wynika, że najlepszym substratem spośród badanych alkoholi alifatycznych jest 12-hydroksydo-dekanol. Należy również zauważyć, że roztwór pirazolu o stę-żeniu 10 mmol/l nie hamuje, a dodanie glutationu nie zwiększa w istotnym stopniu aktywności ADH III.

Swoista aktywność klasy III dehydrogenazy alkoholowej dla roztworu alkoholu kaprylowego o stężeniu 1mmol/l wynosi 1,1 U/mg białka, podczas gdy dla aldehydu mrówkowego jest znacznie wyższa i wynosi 3 U/mg białka [13]. Formaldehyd jest więc lepszym substratem i udział ADH klasy III w jego metabolizmie stanowi jedną z głównych funkcji tego enzymu w organizmie człowieka.

ROLA ADH III W ORGANIZMIE CZŁOWIEKA

Główną funkcją dehydrogenazy alkoholowej klasy III jest udział w eliminowaniu endogenego aldehydu mrówkowego, który jest bardzo toksycznym związkiem, powstającym podczas fizjologicznych przemian metabolicznych. W organizmie człowieka formaldehyd pojawia się również przy zatruciu alkoholem metylowym. Ponadto niektóre napoje alkoholowe zawierają domieszkę metanolu nawet powyżej 0,15 g/l i wówczas ADH III odgrywa rolę w metabolizmie tego alkoholu [8]. W amerykańskiej whiskey zawartość metanolu wynosi 0,26 g/l [3]. Alkohol metylowy pod wpływem ADH I ulega utlenieniu do formaldehydu, który jest następnie eliminowany z udziałem izoenzymu klasy III dehydrogenazy alkoholowej w reakcji, w której dodatkowym substratem jest glutation. Stwierdzono, że ADH klasy III ma identyczną strukturę i właściwości katalityczne, jak glutationozależna dehydrogenaza formaldehydowa [13]. Oba enzymy mają zdolność katalizowania poniższej reakcji:



Bezpośrednim substratem ADH III lub dehydrogenazy formaldehydowej nie jest jednak wolny aldehyd mrówkowy, ale hemitioacetal S-hydroksymetyloglutation, powstający z nieenzymatycznej syntezy formaldehydu i glutationu. Grupa hydroksylowa S-hydroksymetyloglutationu zostaje następnie utleniona z wytworzeniem S-formyloglutationu. Związek ten ulega nieodwracalnej hydrolizie z uwolnieniem glutationu i kwasu mrówkowego w reakcji katalizowanej przez hydrolazę S-formyloglutationową. Dehydrogenaza alkoholowa klasy III utlenia S-hydroksymetyloglutation dużo bardziej wydajnie niż alkohole alifatyczne. Wartość stałej Michaelisa (K_m) ADH III dla tego substratu wynosi 0,92 $\mu\text{mol/l}$, jest więc ponad 100 razy mniejsza niż K_m dla 12-hydroksydodekanolu, który stanowi najlepszy substrat spośród alkoholi długołańcuchowych. Należy jednak zauważyć, że utlenianie S-hydroksymetyloglutationu zachodzi tylko w pH 7,5, stanowiącym optymalne środowisko dla tej reakcji. Natomiast oksydacja alkoholi alifatycznych pod wpływem ADH III w tym właśnie pH jest bardzo mało wydajna, dużo mniejsza niż w pH około 10,5 [11].

Przypuszczalnie izoenzym klasy III ADH ma znaczenie w utlenianiu długołańcuchowych alkoholi, szczególnie

ω -hydroksykwasów tłuszczowych, będących pośrednimi produktami metabolizmu lipidów [6].

ADH III ze względu na małe powinowactwo do etanolu może go utleniać tylko przy jego odpowiednio wysokim stężeniu. W organizmie człowieka takie stężenie alkoholu może występować w żołądku po bezpośrednim spożyciu etanolu. W związku z tym, że dehydrogenaza alkoholowa klasy III wykazuje w błonie śluzowej żołądka stosunkowo dużą aktywność (około 5 nmol/min/mg białka) prawdopodobnie uczestniczy ona w metabolizmie pierwszego przejścia alkoholu etylowego (FPM) w żołądku, choć w dużo mniejszym stopniu niż klasa IV ADH [9].

PODSUMOWANIE

Izoenzym klasy III dehydrogenazy alkoholowej wykazuje zbliżoną budowę do pozostałych izoenzymów ADH, ale zupełnie inne właściwości katalityczne i w związku z tym spełnia odmienne funkcje w organizmie człowieka. ADH III uczestniczy w metabolizmie formaldehydu oraz katalizuje reakcje utleniania długołańcuchowych ω -hydroksykwasów tłuszczowych.

PIŚMIENICTWO

- [1] Agarwal D.P.: Genetic polymorphisms of alcohol metabolizing enzymes. *Pathol. Biol.*, 2001; 49: 703–709
- [2] Crabb D.W., Matsumoto M., Chang D., You M.: Overview of the role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase and their variants in the genesis of alcohol-related pathology. *Proc. Nutr. Soc.*, 2004; 63: 49–63
- [3] Franke A., Teyssen S., Harder H., Singer M.V.: Effect of ethanol and some alcoholic beverages on gastric emptying in humans. *Scand. J. Gastroenterol.*, 2004; 39: 638–644
- [4] Galter D., Carmine A., Buervenich S., Dueter G., Olson L.: Distribution of class I, III and IV alcohol dehydrogenase mRNAs in the adult rat, mouse and human brain. *Eur. J. Biochem.*, 2003; 270: 1316–1326
- [5] Haseba T., Dueter G., Shimizu A., Yamamoto I., Kameyama K., Ohno Y.: *In vivo* contribution of class III alcohol dehydrogenase (*ADH3*) to alcohol metabolism through activation by cytoplasmic solution hydrophobicity. *Biochim. Biophys. Acta*, 2006; 1762: 276–283
- [6] Holmes R.S.: Alcohol dehydrogenases: a family of isozymes with differential functions. *Alcohol Alcohol. Suppl.*, 1994; 2: 127–130
- [7] Hoog J.O., Brandt M., Hedberg J.J., Stromberg P.: Mammalian alcohol dehydrogenase of higher classes: analyses of human *ADH5* and rat *ADH6*. *Chem. Biol. Interact.*, 2001; 130–132: 395–404
- [8] Hoog J.O., Hedberg J.J., Stromberg P., Svensson S.: Mammalian alcohol dehydrogenase – functional and structural implications. *J. Biomed. Sci.*, 2001; 8: 71–76
- [9] Jelski W., Chrostek L., Szmikowski M., Łaszewicz W.: Activity of class I, II, III, and IV alcohol dehydrogenase isoenzymes in human gastric mucosa. *Dig. Dis. Sci.*, 2002; 47: 1554–1557
- [10] Jornvall H.: The alcohol dehydrogenase system. *EXS*, 1994; 71: 221–229
- [11] Julia P., Boleda M.D., Farres J., Pares X.: Mammalian alcohol dehydrogenase: characteristics of class III isoenzymes. *Alcohol Alcohol. Suppl.*, 1987; 1: 169–173
- [12] Kaiser R., Holmquist B., Vallee B.L., Jornvall H.: Human class III alcohol dehydrogenase/glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase. *J. Protein. Chem.*, 1991; 10: 69–73
- [13] Koivusalo M., Baumann M., Uotila L.: Evidence for the identity of glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase and class III alcohol dehydrogenase. *FEBS Lett.*, 1989; 257: 105–109
- [14] Matsushima T.: Alcohol dehydrogenase (ADH). *Nippon Rinsho.*, 2004; 62(Suppl.11): 438–441
- [15] Moreno A., Pares X.: Purification and characterization of a new alcohol dehydrogenase from human stomach. *J. Biol. Chem.*, 1991, 266, 1128–1133
- [16] Sakata R.: A case-control study of association between life-style, alcohol dehydrogenase 2 and aldehyde dehydrogenase 2 genotype and idiopathic osteonecrosis of the femoral head. *Kurume Med. J.*, 2003; 50: 121–130
- [17] Sanghani P.C., Robinson H., Bennett-Lovsey R., Hurley T.D., Bosron W.F.: Structure-function relationships in human class III alcohol dehydrogenase (formaldehyde dehydrogenase). *Chem. Biol. Interact.*, 2003; 143–144: 195–200
- [18] Sreekumar R., Rosado B., Rasmussen D., Charlton M.: Hepatic gene expression in histologically progressive nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*, 2003; 38: 244–251
- [19] Stromberg P., Hoog J.O.: Human class V alcohol dehydrogenase (*ADH5*): A complex transcription unit generates C-terminal multiplicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2000; 278: 544–549
- [20] Stromberg P., Svensson S., Berst K.B., Plapp B.V., Hoog J.O.: Enzymatic mechanism of low-activity mouse alcohol dehydrogenase 2. *Biochemistry*, 2004; 43: 1323–1328
- [21] Strydom D.J., Vallee B.L.: Characterization of human alcohol dehydrogenase isozymes by high-performance liquid chromatographic peptide mapping. *Anal. Biochem.*, 1982; 123: 422–429
- [22] Svensson S., Stromberg P., Sandalova T., Hoog J.: Class II alcohol dehydrogenase (*ADH2*) – adding the structure. *Chem. Biol. Interact.*, 2001; 130–132: 339–350
- [23] Umulis D.M., Gurmen N.M., Singh P., Fogler H.S.: A physiologically based model for ethanol and acetaldehyde metabolism in human beings. *Alcohol*, 2005; 35: 3–12
- [24] Wagner F.W., Pares X., Holmquist B., Vallee B.L.: Physical and enzymatic properties of a class III isozyme of human liver alcohol dehydrogenase: γ -ADH. *Biochemistry* 1984; 23: 2193–2199
- [25] Yang Z.N., Bosron W.F., Hurley T.D.: Structure of human chi chi alcohol dehydrogenase: a glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase. *J. Mol. Biol.*, 1997; 265: 330–343
- [26] Yin S.J., Chou C.F., Lai C.L., Lee S.L., Han C.L.: Human class IV alcohol dehydrogenase: kinetic mechanism, functional roles and medical relevance. *Chem. Biol. Interact.*, 2003; 143–144: 219–227
- [27] Yin S.J., Wang M.F., Liao C.S., Chen C.M., Wu C.W.: Identification of human stomach alcohol dehydrogenase with distinctive kinetic properties. *Biochem. Int.*, 1990; 22: 829–835