Kocatepe Tıp Dergisi
The Medical Journal of Kocatepe (2003 Year Private Issue)
2003 Yılı Özel Sayısı, 59-62
Afyon Kocatepe Üniversitesi

GSTT1 Null Genotipinde Eritrosit Glutatyon Konjugat Transportu

Erythrocyte GSH Conjugate Transport in The GSTT1 Genotype

Ahmet ÖZAYDIN[1], İlhan ONARAN[1], Turgut ULUTİN[1]

[1]*İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyolojik Bilimler Bölümü Tıbbi Biyoloji AD*

ÖZET: Glutatyon S-Transferazların (GST) çok sayıda eksojen ve endojen toksik bileşiği glutatyonla konjuge etmek suretiyle bir ATP'ye bağımlı transport sistemiyle hücrelerden uzaklaştırılmasında aracı bir rol oynadığı bilinmektedir. GSH konjugat transportunun inhibisyonunun hücre içi oksidatif stres artışından yada aralarında antioksidatif enzimlerin de bulunduğu enzimlerin inhibisyonuna neden olduğu bildirilmiştir. GST izoenzimlerinden biri olan GSTT1 insanlarda polimorfik olup; delesyonlu formu Türk toplumunda ~%20 oranında görülmektedir. Çalışmamızda bu enzimin yokluğunun eritrosit glutatyon konjugat transportu üzerindeki etkileri iki model substrat kullanılarak araştırılmıştır. 50 sağlıklı bireyden elde edilen eritrositlerde yaptığımız çalışmalarda hücre içi ATP ve GSH seviyeleri farklılık göstermeyen GSTT 1 null genotipli kişilerde genel bir GST substratı olan CDNB'nin konjugatının transportunun (2,4-dinitrofenil S-glutatyon) GSTT1 pozitif kişilere göre farklılık göstermediği bulunmuştur. Ancak enzimin daha spesifik bir substratı olan bimane ile glutatyonun yapmış olduğu konjugatın (c-bimane S-glutatyon) hücre dışına transport hızının GSTT1 null kişilerde anlamlı olarak düşük olduğu görülmüştür. Bu veriden GSTT1 null genotipli bireylerin ilgili enzimin toksik substratlarına karşı daha fazla risk altında olabilecekleri sonucuna varılabilir.

ABSTRACT: Glutathione S-transferases (GST) play a role in removing exogen and endogen compounds conjugating with glulathione by ATP dependent transport system out of cells. It has been reported that inhibition of GSH conjugate transport system causes increased intracellular oxidative stress or inhibition of enzymes including antioxidative enzymes. GSTT1, one of the GST isoenzymes, is polimorphic in humans and has been seen the deleted form ~20% in Turkish population. We investigated the effect of the absence of this enzyme on the erythrocyte glutathione conjugate transport by using two model substrate. In our studies with erythrocytes from 50 healthy subjects, we found no differences of the transport of the CDNB conjugate (2,4-dinitrophenyl S-glutathione) between GSTT1 null genotypes who have similar intracellular ATP and GSH levels, and GSTT1 positive subjects. However, we found that the transport rate of the bimane conjugate (a spesific substrate of GSTT1 enzyme) out of the cell is markedly low in GSTT1 null subjects. The results suggest that the subject with GSTT1 null genotypes are at a higher risk to toxic substrates of this enzyme.
[Key Words: Glutathione S-transferase, conjugate transport, GSTT1]

GİRİŞ

Biyolojik membranların lipid peroksidasyonu sonucunda oluşan alkenler, epoksitler, hidroperoksitler ve aldehitler gibi toksik ürünler çeşitli Glutatyon S-Transferaz (GST) izoenzimlerinin substratlarıdır. Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda, çeşitli GST enzimleri ile oksidatif stresle ilişkili hastalıklara yatkınlığın artışı arasında bir korelasyon bulunması ve çeşitli dokulardan elde edilen GST enzimlerinin 4-hidroksi alkenal gibi oksidatif stres ürünlerine afinite gösterdiğinin tespit edilmesi, GST'ların oksidatif strese karşı korumadaki önemini ortaya koymaktadır (1)

GST'ların aynı zamanda çok sayıda eksojen ve endojen toksik bileşiği glutatyonla konjuge etmek suretiyle bir ATP'ye bağımlı transport sistemiyle hücrelerden uzaklaştırılmasında aracı bir rol oynadığı bilinmektedir. GSH konjugat transportu olarak adlandırılan sistemin inhibisyonunun hücre içi oksidatif stres artışından ya da çok sayıda enzimin inhibisyonundan sorumlu olduğu bildirilmiştir.

Çeşitli dokularda ve eritrositlerde yapılan çalışmalarda, çok sayıda substrata karşı GST aktivitesinde bireysel farklılıklar olduğu bildirilmiştir. Bu varyasyonların GSTT1 null genotiple ilişkisini bildiren yayınlar da mevcuttur. Ancak bu enzimin polimorfizmini, glutatyonla eksojen maddenin konjugasyonu sonucu oluşan reaktif ürünlerin hücreye zarar vermeden uzaklaştırılmasında etken olan glutatyon S-konjugat transportu üzerindeki etkisi üzerine eritrositlerde bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Çalışmamızda; GSTT1 enzim yokluğunun eritrosit glutatyon konjugat transportu üzerindeki etkisi iki model substrat kullanılarak araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Araştırmamızda yaşları 20-40 arasında değişen rasgele seçilmiş sağlık problemi olmayan (rutin biyokimyasal parametreleri normal sınırlar içersinde, kan sayım parametreleri normal) ve çalışma ile ilgili bilgilendirilmiş 57 bireyden alınan kan örnekleri kullanılmıştır.

Başvuru 10 Eylül 2003. Kabul 15 Aralık 2003.
Yazışma ve tıpkı basım için Ümit Mutlu Türkoğlu, İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, 34093, Çapa, İstanbul
(e-posta: umitdturkoglu@yahoo.com)

YÖNTEMLER

DNA Eldesi ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR): EDTA'lı olarak alınan kanlar DNA izole edilinceye kadar (-70)°C'de saklandı. Miller ve arkadaşlarının yöntemine uygun olarak DNA ekstraksiyonları yapıldı (2)

Bireylerin polimorfizmi lenfositlerden ekstrakte edilen DNA'dan PZR yöntemi ile yapıldı. PZR koşulları Arand ve arkadaşlarının yöntemine göre düzenlendi (3).

Amplifikasyon ürünleri; %2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütüldükten sonra transillüminatörde UV ışık altında görüntülendi. GSTT1 gen delesyonu açısından homozigot olan bireylerde GSTT1 için 480 bç'lik bandların yokluğu saptandı. Kontrol amacıyla 268 bç uzunluğundaki β-globin geni kullanılmıştır.

GSTT1: (F1143, 5' TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC-'3) ve (F1144, 5'-TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA-'3).

İnternal standart olarak β-globin geni: (PC04, 5'-GAA CTT CAT CCA CGT TCA CC-3'; GH20, 5'-GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC-3').

Eritrositlerin Hazırlanması: Heparinli tüplere alınan kanlardan Percoll gradyant tekniği ile eritrositler elde edilmiştir.

Eritrosit GSH S-Konjugat Transportu: Eritrositlerin 2,4-dinitrofenil glutatyon (DNP-SG) transport hızı Awasthi tarafından belirtildiği şekilde tespit edildi (4). Eritrositler, 1mM CDNB içeren PBS ile 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. İşlem sonunda, 30 dakika ara ile alınan örneklerin absorbansı spektrofoto-metrede tesbit edildi. Örneklerdeki GSH konjugat transport hızı molar ekstinksiyon katsayısı kullanılarak hesaplandı ve µmol transport edilen S-(2,4-dinitrofenil) glutatyon /ml eritrosit olarak ifade edildi.

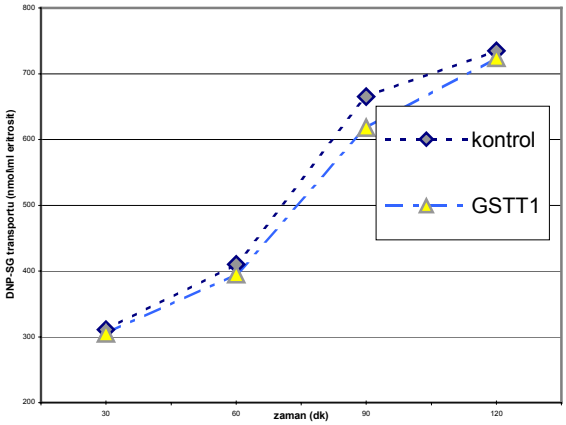
Biman S-Glutatyon Transportu: Eritrositlerde bimane-S-glutatyon (B-SG) trans-portu bazı değişikliklerle önceden tanımlandığı gibi yapıldı (5). Eritrositler, 10 µM c-biman ile oda ısısında 5 dakika inkübe edildi. PBS ile yıkanan hücreler, %5 olacak şekilde transport çözeltisi ile süspende edildi ve 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Süspansiyonlardan 5, 10, 15. dakikalarda alınan örneklerin fluore-sansı spektrofluorometrede 386 eksitasyon ve 476 emisyon dalga boyunda ölçüldü. Sonuçlar ml'deki eritrosit başına fluoresans ünitesi olarak verildi.

Glutatyon S-Konjugatın Uyardığı ATP'az Etkinliği: ATP'az etkinliği; eritrosit membranlarından, ATP'az tamponu içinde 4 mM 2,4-dinitrofenil-S-glutatyon varlığında ve yokluğunda ölçüldü (6)

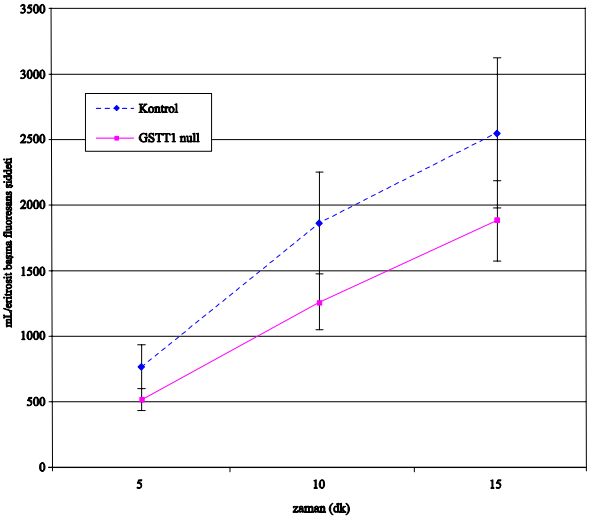
Eritrosit Glutatyon Düzeylerinin Saptanması: (ATP'az etkinliği nmol inorganik fosfor/g Hb/saat (37°C) olarak ifade edildi. (7).

Eritrosit ATP Düzeyleri: Hücre süspansiyonlarının soğuk %12'lik TCA ile çökertilmesinden sonra elde edilen üst sıvıda ATP konsantrasyonları ticari kit kullanılarak üretici firmanın (Sigma) tarifine uygun olarak yapıldı.

İstatiksel Değerlendirme: Genotip gruplarına ait parametrelerin varyanslarının eşitliliği, F testi ile kontrol edildikten sonra, anlamlılıkları eşleşmemiş t testi ile araştırıldı. Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak ifade edildi. $P<0.05$ anlamlılık değeri olarak kabul edildi.



Şekil 1: GSTT1 null genotipe sahip bireylerin eritrositlerinin 2,4-Dinitrofenil S-Glutatyon transportu.



Şekil 2: GSTT1 null genotipe sahip bireylerin eritrositlerine ait B-SG transportu

BULGULAR

Bu çalışmada kullanılan eritrositlerin glutatyon ve ATP seviyeleri gruplar içinde istatistiksel olarak farklı görülmedi. Aynı zamanda örneklerin GS konjugat transporter aktivitesi DNP-SG ile uyarılan ATP'az etkinliği ile bakıldı. Bu etkinlikler açısından da gruplar arasında istatistiksel bir farklılık görülmedi.

Tablo 1. *GSTT1 null genotipli bireylerin eritrositlerinin GSH ve ATP içerikleri ile DNP-SG tarafından stimule edilen ATP'az etkinlikleri*

	GSTT1 null (*n=20*)	**Kontrol** (*n=37*)
Glutatyon (*nmol/ g Hb*)	6.25 ± 1.14	6.17 ± 1.07
ATP (*μmol/ml eritrosit*)	1.38 ± 0.19	1.37 ± 0.26
ATP'az etkinliği (*nmol Pi/mg protein saat*)	420 ± 61	414 ± 52

Eritrosit örneklerinde glutatyon konjugat transportu iki substratla yapıldı. GST konjugat transportunun taşıyıcısının düşük aktiviteli komponentinin etkinliğini ölçmek için CDNB kullanılırken; yüksek aktivitenin etkinliğini ölçmek için bimane kullanıldı. Bu maddelerin glutatyon konjugasyonu ile oluşan ve hücre dışı ortama salınan 2,4-DNP-SG ve B-SG olup; örneklerde her iki konjugatın atılımının zamana bağlı olarak arttığı görülmektedir.

GSTT1 null genotipli grupla kontrol grup karşılaştırıldığında DNP-SG transportu açısından bir farklılık görülmemektedir. Bununla birlikte, eritrositlerin B-SG'nin transport sonuçları incelendiğinde; GSTT1 null grupta B-SG transportu kontrol gruba göre istatistiksel olarak daha düşüktür ($p<0,05$).

SONUÇ

57 sağlıklı bireyden elde edilen eritrositlerde yaptığımız çalışmalarda hücre içi ATP ve GSH seviyeleri farklılık göstermeyen ve glutatyon S-konjugatın ATP'az etkinlikleri kontrol gruptan farklı olmayan GSTT1 null genotipli kişilerde genel bir GST substratı olan CDNB'nin yapmış olduğu konjugatın (2,4-DNP-SG) transportu GSTT1 pozitif kişilere göre farklılık göstermemektedir. Ancak enzimin daha spesifik bir substratı olan bimane ile glutatyonun yapmış olduğu konjugatın (B-SG) hücre dışına transport hızının GSTT1 null kişilerde anlamlı olarak düşük olduğu görülmektedir. Bu verilere dayanılarak, GSTT1 null genotipli bireylerin ilgili enzimin toksik genotipli bireylerin ilgili enzimin toksik substratlarına karşı daha fazla risk altında olabilecekleri sonucuna varılabilir.

KAYNAKLAR

1. Westhuyzen J: The oxidation hypothesis of atherosclerosis: Ann Clin Lab Sci 1997; 27:1-9.
2. Mügge A: The role of reactive oxygen species in atherosclerosis. Z Kardiol 1998; 87:851-864.
3. Uysal M: Ateroskleroz, kalp-damar hastalıkları ve serbest radikaller. Aktüel Tıp Dergisi 2000; 5:15-21.
4. Glavind J, Hartmann S, Clemmesen J, et al : Studies on the role of lipid peroxides in human pathology. II. The presence of peroxidized lipids in the atherosclerotic aorta. Acta Pathol 1952; 30:1-6.
5. Goto Y: Lipid peroxides as a cause of vascular diseases. In: Lipid Peroxides in Biology and Medicine, Ed: K Yagi, Academic Press, New York, 1982;295-303.
6. Stringer MD, Görög PG, Freeman A, et al: Lipid peroxides and atherosclerosis. BMJ 1989; 298:281-284.
7. Plachta H, Bartnikowska E, Obara A: Lipid peroxides in blood from patients with atherosclerosis of coronary and peripheral arteries. Clin Chim Acta 1992; 211:101-112.
8. Blann AD, Maxwell SRJ, Burrows G et al: Antioxidants, von Willebrand factor and endothelial cell injury in hypercho-lesterolemia and vascular disease. Atherosclerosis 1995; 116:191-198.
9. Dubick MA, Keen CL, Di Silvestro RA et al: Antioxidant enzyme activity in human abdominal aortic aneurismal and occlusive disease. Proc Soc Exp Biol Med 1999; 220:39-45.
10. Doğru-Abbasoğlu S, Kanbağlı Ö, Bulur H, et al: Lipid peroxides and antioxidant status in serum of patients with angiograp-hically defined coronary atherosclerosis. Clin Biochem 1999; 32:671-672
11. Uysal M, Kutalp G, Seçkin Ş: The effect of cholesterol feeding on lipid peroxide, glutathione, glutathione peroxidase and glutathione transferase in the liver of rats. Intern J Vit Nutr Res 1988; 58:339-342.
12. Bulur H, Gökkuşu C, Uysal M: Erythrocyte lipid peroxidation and anemia in cholesterol-fed rabbits. Nutr Rep Int 1986; 33:247-251.
13. Del Boccio G, Lapenna D, Porreca E, et al: Aortic antioxidant defence mechanisms: time-related changes in cholesterol-fed rabbits. Atherosclerosis 1990; 81:127-135.
14. Irizar A, Ioannides C: Marked inhibition of hepatic cytochrome P450 activity in cholesterol-induced atherosclerosis in rabbits. Toxicology 1998; 126:179-193.
15. Mahfouz MM, Kummerow FA: Cholesterol-rich diets have different effects on lipid peroxidation, cholesterol oxides, and antioxidant enzymes in rats and rabbits. J Nutr Biochem 2000; 11:293-302.
16. De La Cruz JP, Quintero L, Villalobos MA, al: Lipid peroxidation and glutathione system in hyperlipemic

rabbits: influence of olive oil administration. Biochim Biophys Acta 2000; 1485:36-44.

17. Balkan J, Kanbağlı Ö, Hatipoğlu A, et al: Improving effect of dietary taurine supplementation on the oxidative stress and lipid levels in the plasma, liver and aorta of rabbits fed on a high-cholesterol diet. Biosci Biotechnol Biochem 2002; 66:1755-1758.
18. Nakazawa H, Genka C, Fujishima M : Pathological aspects of active oxy-gens/free radicals. Japan J Physiol 1996; 46: 15-32.
19. Levine RL: Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging and disease. Free Radical Biol Med 2002; 32:790-796.
20. Marnet LJ: Oxy radicals,lipid peroxidation and DNA damage. Toxicology 2002; 181-182:219-222.
21. Leeuwenburgh C, Rasmussen JE, Hsu FF, et al: Mass spectrometric quantification of markers for protein oxidation by tyrosyl radical, copper, and hydroxyl radical in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic plaques. J Biol Chem 1997; 272:3520-3526.
22. Upston JM, Niu X, Brown AJ, et al: Disease stage-dependent accumulation of lipid and protein oxidation products in human atherosclerosis. Am J Pathol 2002; 160:701-710.
23. Harangi M, Remenyik E, Seres I, et al: Determination of DNA damage inducedby oxidative stress in hyperlipidemic patients. Mutation Res 2002; 513:17-25.
24. Gackowski D, Kruszewski M, Jawien A , et al: Further evidence that oxidative stress may be a risk factor responsible for the development of atherosclerosis. Free Radical Biol Med 2001; 31:542-547.
25. Martinet W, Knaapen MWM, De Meyer GRY, et al: Elevated levels of oxidative DNA damage and DNA repair enzymes in human atherosclerotic plaques. Circulation 2002; 106:927-932.
26. Botto N, Masetti S, Manfredi S, et al: Elevated levels of oxidative DNA damage in patients with coronary artery disease. Coron Artery Dis 2002; 13:269-274.
27. Martinet W, Knaapen MWM, De Meyer GRY, et al: Oxidative DNA damage and repair in experimental atherosclerosis are reversed by dietary lipid lowering. Circ Res 2001; 88:733-739.
28. Smith LR, Harrell Jr FE, Rankin S, et al: Determinants of early versus late cardiac death in patients undergoing coronary artery bypass graft surgary. Circulation 1991; 84:III-245-III-253.
29. Buege JA, Aust JD: Microsomal lipid peroxidation. Method Enzymol 1978; 52:302-310.
30. Reznick AZ, Packer L: Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. Method Enzymol 1994; 233:357-363.
31. Benziel FF, Strain JJ: Ferric reducing/ ntioxidant power assay; Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version of simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. Method Enzymol 1999; 299:15-27.
32. Collins AR, Dusinska M, Gedik CM, et al: Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker? Environ Health Perspect 1996; 104 (suppl 3):465-469.
33. Sattler W, Malle E, Kostner GM: Methodological approaches for assessing lipid and protein oxidation and modification in plasma and isolated lipoproteins. Method Mol Biol 1998; 110:167-191.
34. Jialal I, Devaraj S: Low-density lipoprotein oxidation, antioxidants, and atheros-clerosis: a clinical biochemistry perspective. Clin Chem 1996; 42:498-506.
35. Van de Vijyer LPL, Kardinaal AFM, Van Duyvenvoorde W, et al: LDL oxidation and extent of coronary atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1998; 18: 193-199.
36. Mehmetçik G,Toker G, Uysal M: Endogenous and copper-induced lipid peroxidation and antioxidant activity of serum in hypercholesterolemic subjects. Horm Metab Res 1997; 29:63-65.
37. Mutlu-Türkoğlu Ü, Doğru-Abbasoğlu S, Aykaç-Toker G, et al: Increased lipid and protein oxidation and DNA damage in patients with chronic alcoholism. J Lab Clin Med 2000; 136: 287-291.