

IWONA RYBAKOWSKA<sup>1</sup>, MACIEJ KRZYŻANOWSKI<sup>2</sup>, MAGDALENA STĘPIŃSKA<sup>1</sup>,  
STANISŁAW BAKUŁA<sup>3</sup>, KRYSZTIAN KALETHA<sup>1</sup>

## WŁAŚCIWOŚCI CHROMATOGRAFICZNE I KINETYCZNO- -REGULACYJNE DEAMINAZY AMP WYIZOLOWANEJ Z SERCA DZIECKA Z MUTACJĄ C34T W GENIE *AMPD1*

AMP-DEAMINASE FROM CHILD HEART WITH *AMPD1* MUTATION  
– CHROMATOGRAPHY AND REGULATORY PROPERTIES OF NORMAL  
ENZYME AND AFFECTED BY A MUTATION ENZYME

<sup>1</sup> Zakład Biochemii i Fizjologii Klinicznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego  
kierownik: prof. dr hab. Krystian Kaletha

<sup>2</sup> Katedra i Zakład Medycyny Sądowej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego  
kierownik: dr hab. Zbigniew Jankowski

<sup>3</sup> Katedra Rehabilitacji Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego  
kierownik: dr hab. Stanisław Bakula, prof. nadzw.

Niedobór deaminazy AMP jest jedną z najczęstszych enzymopatii. Defekt dziedziczony jest w sposób autosomalny recesywny i najczęściej jest skutkiem mutacji punktowej C34T (Gln→Stop) genu *AMPD1*, kodującego izozym mięśniowy deaminazy AMP. Jednym z metabolicznych następstw tej mutacji wydaje się być wzmożona produkcja adenozyiny przez mięśnie szkieletowe. Wzrost stężenia adenozyiny w krwiobiegu powoduje rozkurcz naczyń tętniczych, także wieńcowych, przyczyniając się przez to do polepszenia rokowania i łagodniejszego przebiegu przewlekłej niewydolności serca. Przedstawione wyniki badań wskazują, że w sercu dziecka z mutacją C34T genu *AMPD1* aktywność deaminazy AMP jest obniżona, a właściwości chromatograficzne i kinetyczno-regulacyjne enzymu zmodyfikowane. Sprzyjać to może lokalnemu wzrostowi produkcji adenozyiny przez pracujący mięsień sercowy.

Deaminaza AMP (AMP-aminohydrolaza – EC 3.5.4.6.) katalizuje reakcję deaminacji kwasu adenylogowego (AMP) do kwasu inozynowego (IMP).

U człowieka enzym ten kodowany jest przez rodzinę trzech niezależnych genów (*AMPD1*, *AMPD2*, *AMPD3*) odpowiedzialnych za syntezę izoenzymów: mięśniowego (M), wątrobowego (L) i erytrocytarnego (E) [8].

W mięśni szkieletowym człowieka dorosłego ekspresja genu *AMPD1* wyraźnie dominuje. W mięśni tym aktywność deaminazy AMP wielokrotnie przewyższa aktywność tego enzymu w pozostałych tkankach. W mięśni szkieletowym znaczenie fizjologiczne katalizowanej przez de-

aminazę AMP reakcji wiąże się głównie z funkcjonowaniem cyklu nukleotydów purynowych [7]. W ramach tego cyklu, we współdziałaniu z miokinazą, deaminaza AMP uczestniczy w odtworzeniu zużywającego się ATP, zapewniając energię we wstępnym okresie aktywności ruchowej mięśnia.

Niedobór deaminazy AMP zaliczany jest do najczęstszych enzymopatii [3]. Defekt ten, w postaci homo- lub heterozygotycznej, występuje u około 20% populacji ludzkiej. Wyróżniamy dwie postaci enzymopatii: pierwotną i wtórną. Postać wtórna ma charakter niespecyficzny i jest skutkiem uszkodzenia mięśni szkieletowych w przebiegu różnych schorzeń układu mięśniowego i nerwowego. U osób tych, poza obniżeniem aktywności deaminazy AMP obserwuje się również obniżenie aktywności innych enzymów mięśniowych, takich jak kinaza kreatyny czy kinaza adenylanowa [2].

Postać pierwotna enzymopatii, dziedziczona w sposób autosomalny, recesywny, jest następstwem mutacji w chromosomie 1 (1p13-p21), zawierającym gen kodujący izozym mięśniowy [10]. Osoby dotknięte tą postacią enzymopatii uskarżają się czasami na przykurcze i powysiłkowe bóle mięśniowe. Zmiany genetyczne w tej postaci defektu są najczęściej skutkiem mutacji punktowej C34T (Gln12→Stop), w kodonie 12 eksonu 2. U homozygoty mutacja ta tworząc kodon STOP przedwcześnie kończy proces translacji i powoduje syntezę nieaktywnego enzymu.

W mięśniu sercowym rola katalizowanej przez deaminazę AMP reakcji wiąże się głównie z utrzymywaniem w komórce sercowej odpowiedniego stężenia nukleotydów adenylowych oraz z utrzymaniem prawidłowych wartości ładunku energetycznego adenylanów (ŁEA). W mięśniu sercowym ekspresji podlegają wszystkie trzy geny rodziny kodującej enzym, jednakże w porównaniu z mięśniem szkieletowym, ekspresja genu *AMPD1* jest tutaj tylko nieznaczna.

Deaminazę AMP z serca ludzkiego wyizolowano po raz pierwszy w 1979 roku [5]. Badania późniejsze z użyciem zmodyfikowanej procedury preparatywnej [9] uwidoczniły, w wpływającym podczas chromatografii enzymu eluacie aktywność o kinetyce sigmoidalnej, z silnie zaznaczonym regulacyjnym wpływem ATP, ADP oraz ortofosforanu.

## CEL PRACY

Celem niniejszej pracy było porównanie niektórych właściwości kinetyczno-regulacyjnych deaminazy AMP serca dziecka z mutacją C34T w genie *AMPD1* z takimi samymi właściwościami enzymu wyizolowanego z serca dziecka o prawidłowym genotypie *AMPD1*.

## MATERIAŁ I METODY

Materiałem do izolacji enzymu były serca dzieci, zmarłych śmiercią nagłą, pozyskiwane w trakcie autopsji przeprowadzanych w Zakładzie Medycyny Sądowej GUMeD, w czasie 12-24 godzin po śmierci. W homogenacie jednego z serc dziecięcych aktywność deaminazy AMP okazała się wyraźnie niższa od przeciętnej. Przeprowadzona analiza genotypowa tkanki wykazała w obrębie genu *AMPD1* obecność mutacji (C34T), o charakterze heterozygotycznym.

### Oczyszczanie enzymu

Enzym oczyszczano wedle zmodyfikowanej procedury Sueltera [9]. Zamrożone mięśnie komór serca (o łącznej masie około 10 g) rozdrabniano, a następnie homogenizowa-

no w trzykrotnej objętości buforu ekstrakcyjnego Smiley'a (0,18 M KCl, 0,054 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,035 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1 mM merkaptoetanol), zawierającego dodatkowo inhibitor trypsyny oraz fluorek fenylometylosulfonylu (PMSF). Otrzymany homogenat mieszano przez 1 godzinę w temperaturze 4 °C, po czym odwirowywano przez pół godziny przy 18000×g i następnie przesączano przez potrójną warstwę gazy. Uzyskany supernatant mieszano przez 40 minut z 2,5 g uprzednio zrównoważonej (doprowadzonej do pH 6,5) fosfocelulozy, po czym nanoszono na kolumnę o wymiarach 1,3 cm × 20 cm. Zaadsorbowany na fosfocelulozie enzym przepłukiwano 0,4 M i 0,75 M roztworem chlorku potasu, a następnie wypłukiwano z kolumny 0,75-2 M gradientem stężeń tej soli, przy szybkości wypływu około 7 ml/h.

Do doświadczeń używano roztwór otrzymany ze zlania frakcji o najwyższej aktywności specyficznej. W wyniku przeprowadzonej chromatografii uzyskano kilkunastokrotnie oczyszczone preparaty enzymatyczne o aktywności specyficznej 1,4 i 0,5  $\mu\text{mola}/\text{min}/\text{mg}$  białka, odpowiednio dla enzymu pochodzącego z serca o genotypie *AMPD1* prawidłowym i zmutowanym.

### Pomiary kinetyczne

Aktywność enzymatyczną oznaczano metodą fenolowo-podchlorynową Chaney'a i Marbacha [1]. Mieszanina reagująca (o objętości końcowej 0,5 ml) zawierała rozpuszczony w 0,05 M buforze bursztynianowym, pH 6,5 substrat (5-AMP), o stężeniach: 0,8; 1,6; 3,2; 6,4; 9,6; 12,8; 25,6 i 51,2 mM), oraz, ewentualnie, efekторы (ATP, ADP i ortofosforan odpowiednio w stężeniach 1,1 oraz 2,5 mM). Próby ślepe zawierały najwyższe stężenia substratu, oraz ewentualnie, efektor lub enzym. Reakcję rozpoczynano dodaniem do mieszaniny inkubacyjnej roztworu enzymu, zawierającego 2  $\mu\text{g}$  białka. Po upływie 15 min reakcję przerywano, dodając do mieszaniny reagującej 1 ml odczynnika fenolowego.

Parametry kinetyczne reakcji (szybkość maksymalną reakcji- $V_{\text{max}}$ , stałą półwysycenia enzymu substratem –  $S_{0,5}$  oraz współczynnik kooperatywności –  $n_H$ ) obliczano korzystając z programu Sigma Plot.

W celu wykazania mutacji C34T w genie *AMPD1* wykorzystywano DNA wyizolowany z mięśnia sercowego. Startery zaprojektowano w oparciu o sekwencję genomową *AMPD1* (GI:886260). Amplifikację docelowego DNA przeprowadzano (w warunkach zaleczanych przez producenta) przy użyciu polimerazy HotStar Taq (1,5 U). Obecność mutacji C34T w amplifikowanym DNA potwierdzano za pomocą analizy SSCP (*single stranded conformational polymorphism*) oraz metody RFLP (*restriction fragment length polymorphism*).

### WYNIKI

W tabeli I porównano średnią aktywność deaminazy AMP w homogenatach oraz aktywność oczyszczonego enzymu serc dzieci o genotypie *AMPD1* prawidłowym z aktywnością homogenatu serca dziecka o genotypie zmutowanym. Jak to wynika z przedstawionych w tabeli danych, aktywność deaminazy AMP w homogenacie serca dziecka o genotypie *AMPD1* zmutowanym była wyraźnie niższa i stanowiła około 75% aktywności znajdowanej w homogenatach serc dzieci o genotypie prawidłowym.

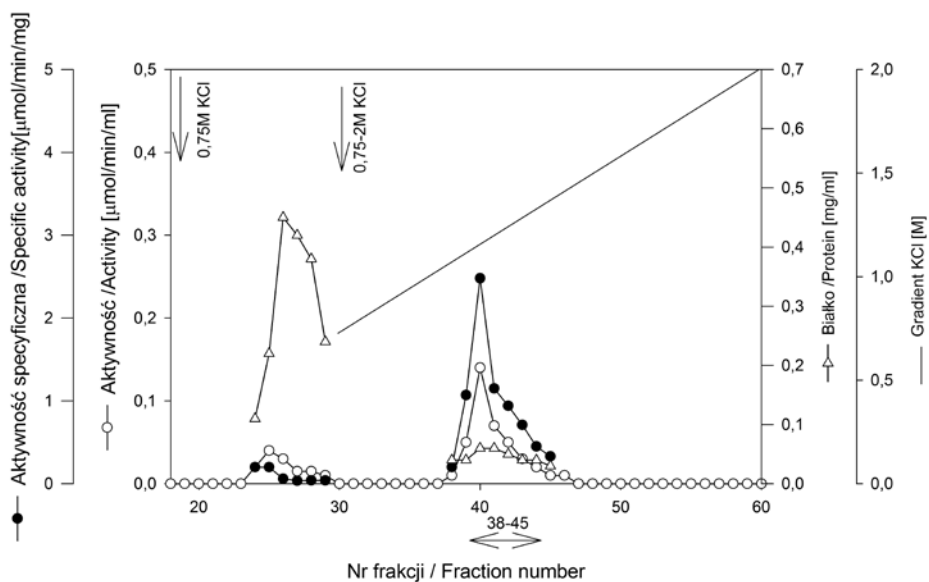
Tabela I. Aktywność deaminazy AMP w homogenatach serca dziecka

Table I. AMP-deaminase activity in child heart homogenates

Serce dziecka Child heart	Aktywność specyficzna deaminazy AMP w homogenacie tkankowym Specific activity [ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ]	Enzym oczyszczony Specific activity [ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ]
P	$0,07 \pm 0,01$	1,4
HT	0,05	0,5

P – homogenat serca dziecka o prawidłowym genotypie *AMPD1* / the homogenate prepared from cardiac muscle of the normal genotype of *AMPD1*

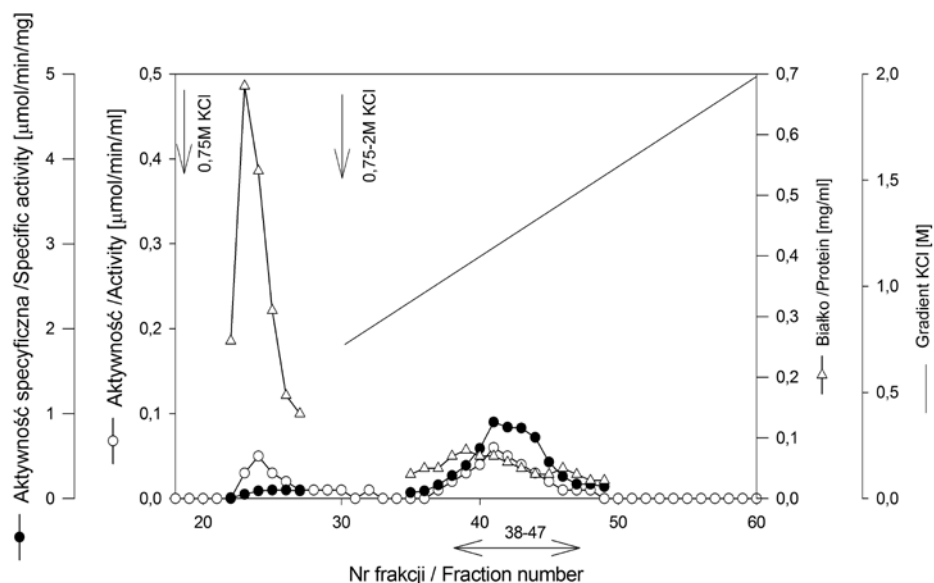
HT – homogenat serca dziecka o nieprawidłowym genotypie *AMPD1* (mutacja C34T w genie *AMPD1*) / the homogenate prepared from cardiac muscle of the *AMPD1* C34T mutation



Ryc. 1A. Chromatografia deaminazy AMP na kolumnie z fosfofelulozą. Enzym izolowany z serca dziecka o prawidłowym genotypie *AMPD*

Fig. 1A. Chromatography of AMP-deaminase on a phosphocellulose column. Enzyme isolated from child heart with normal genotype *AMPD*

Na rycinie 1A i ryc. 1B zilustrowano właściwości chromatograficzne deaminazy AMP wyizolowanej z serc dzieci o genotypie *AMPD1* prawidłowym (A) i zmutowanym (B). Jak to wynika z przedstawionych profili, enzym serca dziecka o genotypie zmutowanym, w porównaniu z tym samym, pochodzącym z serca dziecka o genotypie prawidłowym, uformował szczyt aktywności mniej zwarty, bardziej rozmyty.



Ryc. 1B. Chromatografia deaminazy AMP na kolumnie z fosfocelulozą. Enzym izolowany z serca dziecka o zmutowanym genotypie *AMPD*

Fig. 1B. Chromatography of AMP-deaminase on a phosphocellulose column. Enzyme isolated from child heart with mutation in genotype *AMPD*

Tabela II. Wpływ efektorów allosterycznych na wartości parametrów kinetycznych reakcji katalizowanej przez deaminazę AMP serca dziecka o genotypie prawidłowym (P) i zmutowanym (HT)

Table II. Effect of allosteric effectors on kinetic parameter of heart AMP-deaminase; P – normal genotype of *AMPD1*, HT – heterozygous of *AMPD1*

Dodany efektor Effector added	Grupa Group		$S_{0.5}$ (mM)		$V_{max}$ ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ białka) ( $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein)		$n_H$	
	P	HT	P	HT	P	HT	P	HT
Brak efektora / Control	7,3	12,5	2,4	1,9	2,3	0,8		
ATP	1,3	0,8	2,5	1,7	1,2	1,0		
ADP	3,0	1,5	2,2	1,6	1,0	1,3		
Pi	11,4	8,4	2,3	1,6	2,2	2,5		

Przedstawione wartości stanowią średnie z trzech niezależnych oznaczeń. Wartości SD dla tych oznaczeń mieściły się w zakresie  $\pm 10\%$  wartości średnich

The data represents the mean of three independent experiments. SD did not exceed 10% of the mean value

W tabeli II porównano właściwości kinetyczno-regulacyjne deaminazy AMP wyizolowanej z serc dzieci o porównywanych genotypach *AMPD1*. Jak to wynika z przedstawionych w tabeli danych, krzywa wysycenia enzymu substratem dla deaminazy AMP pochodzącej z serca dziecka o genotypie *AMPD1* zmutowanym, prezentowała profil nieregularnej hiperboli ( $n_H \approx 0,8$ ), ze stałą półwysycenia ( $S_{0,5}$ ) prawie dwukrotnie wyższą (12,5 mM) od wartości  $S_{0,5}$  wyliczonej dla enzymu pochodzącego z serca dziecka o prawidłowym genotypie *AMPD1* (7,3 mM). W obecności 1 mM stężeń ATP i ADP, ale także w obecności 2,5 mM ortofosforanu wartości  $S_{0,5}$  wyliczone dla enzymu pochodzącego z serca dziecka o genotypie *AMPD1* zmutowanym były wyraźnie niższe od odpowiednich stałych wyznaczonych dla enzymu pochodzącego z serca dziecka o prawidłowym genotypie *AMPD1*.

## DYSKUSJA

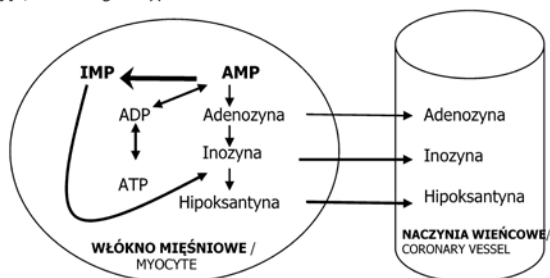
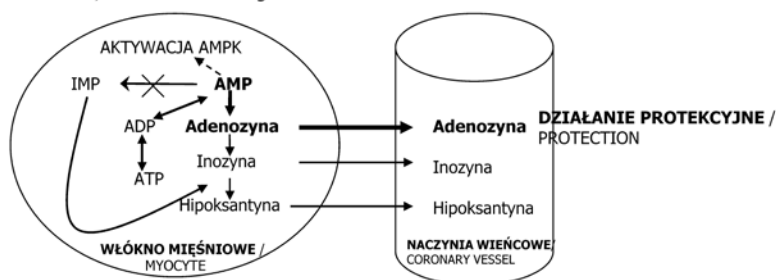
W mięśniu szkieletowym ludzi dorosłych o zmutowanym (mutacja C34T) genotypie *AMPD1*, ekspresji izozymu mięśniowego deaminazy AMP (izozymu M, *AMPD1*) praktycznie nie ma (u homozygot), albo też jest ona wyraźnie obniżona (u heterozygot) [10]. W mięśniu sercowym człowieka dorosłego o prawidłowym genotypie *AMPD1* ekspresja izozymu mięśniowego zachodzi, lecz w porównaniu z mięśniem szkieletowym, jest niewielka. To samo dotyczy najpewniej serca kilkunastoletniego dziecka.

Ekspresja genu *AMPD1*, i co za tym idzie poziom izozymu *AMPD1* w sercu człowieka, choć ilościowo niewielkie, ze względu na właściwości kinetyczno-regulacyjne, jakie izozym ten prezentuje, mogą dla metabolizmu serca być jednak istotne. Jak to wynika z tabeli I, w homogenacie serca dziecka o nieprawidłowym genotypie *AMPD1* aktywność deaminazy AMP jest rzeczywiście obniżona, zaś właściwości chromatograficzne i kinetyczno-regulacyjne prezentowane przez operujący w tym sercu enzym, wyraźnie zmodyfikowane (ryc. 1, tabela II). Istotą tej modyfikacji jest zwiększona podatność na aktywujący wpływ nukleotydów adeninowych, oraz zmniejszona podatność na hamujące oddziaływanie ortofosforanu.

W sercu człowieka udział wymienionych enzymów w degradacji AMP jest mniej zróżnicowany. W niedokrwionym sercu ludzkim około 70% AMP ulega przekształceniu do adenozyiny, zaś tylko 30% do kwasu inozynowego. Jednak nawet w tych warunkach rola deaminazy AMP w metabolizmie energetycznym serca pozostaje nadal znacząca.

Zgodnie z prezentowanymi obecnie poglądami kardioprotekcyjna rola mutacji C34T w genie *AMPD1* wynika z towarzyszącej jej wzmożonej produkcji adenozyiny [4]. Produkcja ta jest wynikiem skierowania, w warunkach niedoboru mięśniowej deaminazy AMP, katabolizmu AMP na alternatywny szlak przemian z udziałem 5'nukleotydu wytwarzającej adenozyinę (ryc. 2). Z przeprowadzonych, na populacji ludzkiej badań wynika, że chociaż powysiłkowy wzrost stężenia adenozyiny we krwi zauważalny jest jedynie u osób homozygotycznych, to jednak znacząca w tej sprawie może być również większa produkcja lokalna. Zatem nie tylko ogólnoustrojowy (mający swe źródło w mięśniach szkieletowych), ale także i lokalny (mający swe źródło w mięśniu sercowym) wzrost produkcji adenozyiny może przyczyniać się do poprawy metabolizmu energetycznego serca wpływając w ten sposób na przeżywalność chorych z niewydolnością serca [6].

Przedstawione w pracy wyniki wskazują na obniżenie aktywności deaminazy AMP w sercu o zmutowanym genotypie *AMPD* (0,07  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  białka u osobnika zdrowego wobec 0,05  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  białka u osobnika z mutacją).

**Prawidłowy genotyp / Normal genotype****Mutacja C34T genu *AMPD1* / C34T mutation in gene *AMPD1***Ryc. 2. Metaboliczne następstwa mutacji C34T genu *AMPD1* (według Kaletha K. i in. [4]).Fig. 2. Metabolic consequences of C34T mutation in gene *AMPD1* (according to Kaletha K. et al. [4])

Obniżenie aktywności i zaobserwowane modyfikacje właściwości kinetyczno-regulacyjnych enzymu [11], jakkolwiek wyraźne, dotyczą jednak tylko jednego przypadku. Poszukiwanie następnych przypadków mutacji pozwoli z pewnością uzyskać odpowiedź bardziej pewną i jednoznaczną w tej kwestii.

## WNIOSKI

Uzyskane wyniki wskazują na dość wyraźne obniżenie aktywności deaminazy AMP w sercu osobnika o zmutowanym genotypie C34T.

Wyizolowany z takiego serca enzym wykazuje odmienne w stosunku do enzymu pochodzącego z serca osobnika zdrowego właściwości chromatograficzne i kinetyczno-regulacyjne.

Czy opisane powyżej zmiany właściwości enzymu mogą mieć znaczenie prognostyczne dla rozwoju niewydolności serca pozostaje sprawą do dalszych badań eksperymentalnych i klinicznych.

## PIŚMIENNICTWO

1. Chaney A.L., Marbach E.P.: Modified reagents for determination of urea and ammonia. Clin. Chem. 1962, 8, 130. – 2. Fishbein W.N.: Myoadenylate deaminase deficiency: primary and secondary types.

Toxicol. Ind. Health. 1986, 2, 2, 105. – 3. Fishbein W.N., Armbrustmacher V.W., Griffin J.L.: Myoadenylate deaminase deficiency: a new disease of muscle. Science 1978, 200, 4341, 545. – 4. Kaletha K., Nowak G., Adrych K., Makarewicz W.: Myoadenylate Deaminase deficiency. Post. Biochem. 1991, 37, 2, 58. – 5. Kaletha K., Skladanowski A., Bogdanowicz S., Zydowo M.: Purification and some regulatory properties of human heart adenylate deaminase. Int. J. Biochem. 1979, 10, 11, 925. – 6. Loh E., Rebbeck T.R., Mahoney P.D., DeNofrio D., Swain J.L., Holmes E.W.: Common variant in AMPD1 gene predicts improved clinical outcome in patients with heart failure. Circulation 1999, 99, 11, 1422. – 7. Lowenstein J.M.: Ammonia production in muscle and other tissues: the purine nucleotide cycle. Physiol. Rev. 1972, 52, 2, 382. – 8. Morisaki T., Sabina R.L., Holmes E.W.: Adenylate deaminase. A multigene family in humans and rats. J. Biol. Chem. 1990, 265, 20, 11482. – 9. Nowak G., Kaletha K.: Molecular forms of human heart muscle AMP deaminase. Biochem. Med. Metab. Biol. 1991, 46, 2, 263. – 10. Rotzer E., Mortier W., Reichmann H., Gross M.: The genetic basis of myoadenylate deaminase deficiency is heterogeneous. Adv. Exp. Med. Biol. 1998, 431, 129.

11. Rybakowska I., Bakula S., Klimek J., Milczarek R., Smolenski R.T., Kaletha K.: Cardiac muscle AMP-deaminase from a 10-year-old male heterozygous for the AMPD1 C34T mutation. Nucleos. Nucleot. Nucl. Acids. 2010, 29, 4/6, 453.

I. Rybakowska, M. Krzyżanowski, M. Stępińska, S. Bakula, K. Kaletha

AMP-DEAMINASE FROM CHILD HEART WITH *AMPD1* MUTATION  
– CHROMATOGRAPHY AND REGULATORY PROPERTIES OF NORMAL ENZYME  
AND AFFECTED BY A MUTATION ENZYME

Summary

Deficiency of AMP-deaminase is one of the most frequent enzymopathies. The disorder has autosomally recessive character and most often is a result of C34T point mutation (Gln→Stop) in *AMPD2* gene, coding muscle isozyme of AMP-deaminase. One of the metabolic consequences of this mutation is increased production of adenosine by affected skeletal muscles. The augmented level of adenosine in circulation causes relaxation of arterial vessels, improving the course and prognosis of patients with chronic heart insufficiency. The presented data indicate that in C34T mutation affected AMPD1 cardiac muscle, the activity of AMP-deaminase is significantly decreased and chromatography and kinetic properties of the enzyme significantly modified. This may intensify the local production of adenosine by the working cardiac muscle.

Autor: dr n. med. Iwona Rybakowska  
Zakład Biochemii i Fizjologii Klinicznej GUMed  
ul. Dębinki 1, 80-210 Gdańsk  
e-mail: iwonar@gumed.edu.pl