

IWONA RYBAKOWSKA¹, MAGDALENA STĘPIŃSKA¹, MACIEJ KRZYŻANOWSKI²,
GRZEGORZ SZREDER³, STANISŁAW BAKUŁA⁴, KRYSZTIAN KALETHA¹

DEAMINAZA AMP MIĘŚNIA SERCOWEGO W ONTOGENEZIE CZŁOWIEKA

HUMAN HEART AMP-DEAMINASE IN ONTOGENESIS

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

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

³Pomorskie Centrum Traumatologiczne Gdańsk

⁴Katedra Rehabilitacji Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
kierownik: dr hab. Stanisław Bakula, prof. nadzw.

W ontogenezie człowieka skład izozymowy deaminazy AMP w mięśniu szkieletowym ulega zmianom. Prezentowane w pracy wyniki sugerują, że ontogenetycznie uwarunkowane zmiany składu izozymowego deaminazy AMP zachodzą również w mięśniu sercowym.

Deaminaza AMP (AMP – aminohydrolaza – EC 3.5.4.6.) katalizuje nieodwracalną, hydrolytyczną deaminację kwasu adenylowego (AMP) do kwasu inozynowego (IMP).

U człowieka deaminaza AMP kodowana jest przez rodzinę trzech, niezależnych genów, odpowiedzialnych za syntezę izoenzymów: mięśniowego (M, AMPD1), wątrobowego (L, AMPD2) oraz erytrocytarnego (E, AMPD3) [7].

W mięśniach szkieletowych ssaków, gdzie aktywność deaminazy AMP jest wielokrotnie wyższa aniżeli w pozostałych tkankach i narządach, znaczenie fizjologiczne katalizowanej przez deaminazę AMP reakcji wiąże się głównie z funkcjonowaniem cyklu nukleotydów purynowych [6]. W mięśniu sercowym natomiast, wydaje się ona być związana bardziej z utrzymaniem właściwej puli nukleotydów adenilowych oraz prawidłowych wartości ładunku energetycznego adenylanów (LEA).

Deaminazę AMP z serca ludzkiego wyizolowano w roku 1979 [4]. Zaadsorbowany na fosfocelulozie enzym, wypływał z kolumny w jednym szczycie aktywności i w obecności 100 mM KCl prezentował sigmoidalną kinetykę wysycenia, ze stałą półwysycenia około 7 mM. Obecność 1 mM ATP zmieniała sigmoidalny kształt krzywej kinetycznej na hiperboliczny obniżając wartość tej stałej do około 3 mM. 2 mM ortofosforan sigmoidalność krzywej pogłębiał, podwyższając wartość stałej półwysycenia do około 8 mM. Badania późniejsze

z użyciem zmodyfikowanej procedury preparatywnej [8], uwidoczniły w wypływającym z kolumny eluacie dwa szczyty aktywności, z których pierwszy mało aktywny wypływał przy 0,75 M stężeniu KCl, zaś drugi zasadniczy wypływał z kolumny w 0,75-2 M gradiencie stężenia tej soli [8].

W rozwoju ontogenetycznym człowieka, w mięśniu szkieletowym zaobserwować można stopniową zmianę składu izozymowego deaminazy AMP. Pojawiające się kolejno formy enzymu embrionalna i płodowa, w miarę dojrzewania tkanki, zastąpione zostają ostatecznie przez formę dojrzałą [3]. O składzie izozymowym deaminazy AMP w mięśniu sercowym ssaków oraz formach rozwojowych tego enzymu wiadomo niewiele. Badania autorów japońskich wykazały, że w pierwszych tygodniach życia pozapłodowego, skład izozymowy deaminazy AMP serca szczura ulega wyraźnym zmianom, pozwalając wyróżnić trzy, chromatograficznie odmienne formy enzymu w okresie noworodkowym, przechodzące w późniejszym okresie życia w jedną, chromatograficznie jednorodną izoformę dojrzałą, znajdowaną w sercu szczura dorosłego [9].

CEL PRACY

Celem niniejszej pracy jest zbadanie aktywności oraz właściwości chromatograficznych i kinetyczno-regulacyjnych deaminazy AMP, wyizolowanej z serca ludzkiego w trzech różnych etapach rozwoju osobniczego człowieka.

MATERIAŁ I METODY

Przeprowadzone badania uzyskały wcześniejszą zgodę Niezależnej Komisji Etyki Badań Naukowych przy Akademii Medycznej w Gdańsku nr NKEBN/413/2000.

Materiałem do izolacji enzymu były serca osób dorosłych (5 osób w wieku od 40 do 45 lat), pozyskane podczas autopsji przeprowadzanej (12-24 godziny po nagłej śmierci) w Zakładzie Medycyny Sądowej GUM lub serca noworodków (5 osób w wieku do jednego miesiąca) i płodów (15 płodów w 27-28 tygodniu) pozyskanych podczas autopsji przeprowadzanej (12-24 godziny po śmierci) w II Klinice Położnictwa i Ginekologii GUM. Pozyskane tkanki zamrażano w temperaturze -70°C , zapobiegając w ten sposób spadkowi aktywności enzymatycznej, a potem po uprzednim rozmrożeniu, używano dla celów preparatywnych.

Zamrożone komory mięśnia sercowego (o łącznej masie około 10 g) rozdrabniano, a następnie homogenizowano w trzykrotnej objętości buforu ekstrakcyjnego Smiley'a, zawierającego dodatkowo inhibitor trypsyny (w stężeniu $1\ \mu\text{g/ml}$) oraz 1 mM fluorek fenylometylosulfonylu (PMSF). Oczyszczanie enzymu prowadzono wedle zmodyfikowanej metody Sueltera opisanej uprzednio [8]. Zaadsorbowany na fosfocelulozie enzym przepłukiwano 0,4 M i 0,75 M KCl, a następnie eluowano 0,75-2 M gradientem stężeń chlorku potasu, przy szybkości wypływu około 7 ml/h.

W wyniku chromatografii na fosfocelulozie wyekstrahowany z mięśnia sercowego enzym oczyszczony został blisko dwudziestokrotnie, a uzyskane w wyniku tego procesu preparaty enzymatyczne (otrzymane ze zlania najbardziej aktywnych frakcji eluatu) prezentowały aktywność specyficzną wynoszącą odpowiednio blisko 1,4; 2,5 i 0,9 μmol uwolnionego amoniaku na minutę, na miligram białka dla preparatu pochodzącego z serca płodu, noworodka i dojrzałego

człowieka. Uzyskane preparaty enzymatyczne wykazywały dużą aktywność substratową nie rozkładając, w stopniu dla pomiarów kinetycznych istotnym, adenozyiny w stężeniu 10 mM.

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) oraz efekторы (ATP, ADP, ortofosforan). Po ustaleniu się temperatury (30°C), reakcję rozpoczynano dodaniem do mieszaniny inkubacyjnej 50 µl roztworu enzymu.

Parametry kinetyczne reakcji (szybkość maksymalną reakcji – V_{max} , stałą półwysycenia enzymu substratem – $S_{0,5}$) obliczano przy użyciu programu SigmaPlot.

Różnice pomiędzy aktywnościami oraz parametrami kinetycznymi w badanych grupach były oznaczane poprzez One-Way Anova Variance (ANOVA). Dla dalszego określania istotności różnic użyto testu post-hoc Tukey'a przyjmując granicę różnicy istotnej statystycznie $p < 0,05$.

WYNIKI

Tabela I przedstawia średnie aktywności deaminazy AMP w homogenatach serc ludzkich: płodowego, noworodkowego i dojrzałego okresu ontogenezy. Jak to wynika z przedstawionych w tabeli danych, średnia aktywność specyficzna enzymu w sercu noworodka jest najwyższa spośród aktywności znajdujących w sercu płodu oraz człowieka dorosłego.

Rycina 1A-C przedstawia rozdziały chromatograficzne deaminazy AMP serca ludzkiego w wymienionych okresach rozwoju osobniczego. Jak wynika z przedstawionych na rycinie chromatografii, elucja zaadsorbowanego na fosfocelulozie enzymu w poszczególnych etapach ontogenezy prezentowała podobny profil, tzn. pozwoliła wyróżnić w każdym z nich dwa szczyty aktywności, z których pierwszy, wypłukiwany 0,75 M chlorkiem potasu, mało aktywny, reprezentował enzym w dużej mierze zdegradowany, natomiast drugi, wypłukiwany

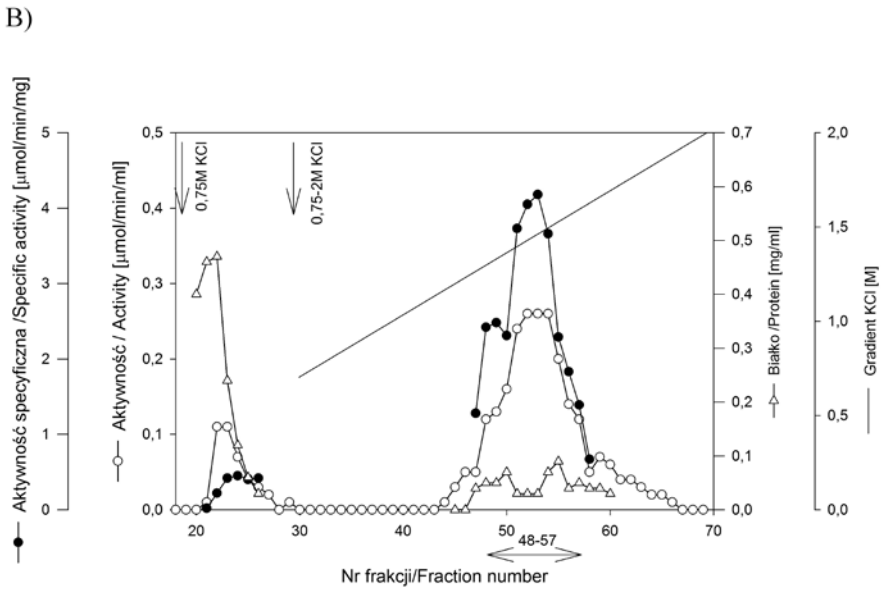
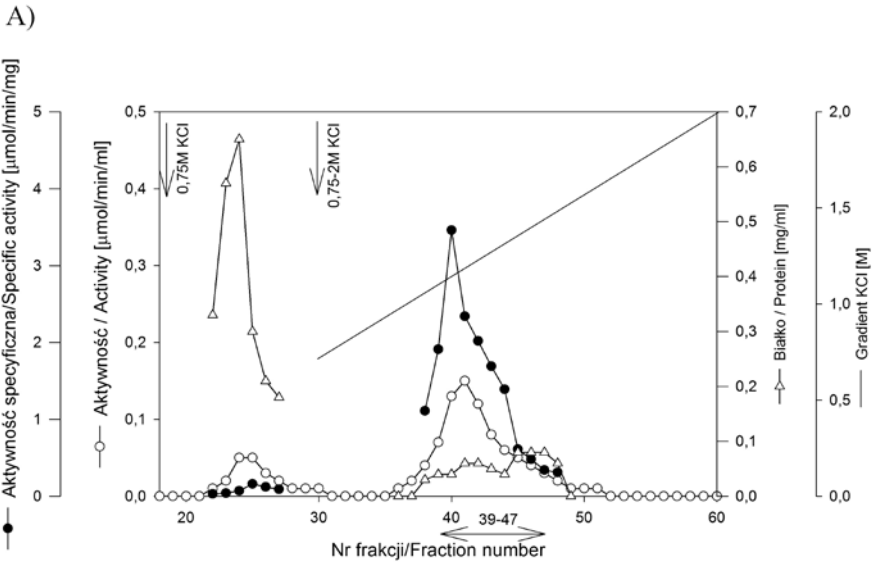
Tabela I. Aktywność deaminazy AMP w homogenatach serc ludzkich

Table I. AMP-deaminase activity in the human heart homogenates

| Okres rozwoju osobniczego/ Developmental period | Aktywność specyficzna deaminazy AMP w homogenacie serca ludzkiego/ Specific activity [µmol/min/mg] |
|--|---|
| płodowy / fetal | 0,07 (± 0,03) |
| noworodkowy / neonatal | 0,09 (± 0,03) |
| dojrzały / mature | 0,07 (± 0,01) |

Uzyskane wyniki stanowią wartość średnią (±SD) z pięciu niezależnych preparatyk. Wartości przedstawione w tabeli nie wykazały różnic istotnych statystycznie $p > 0,05$.

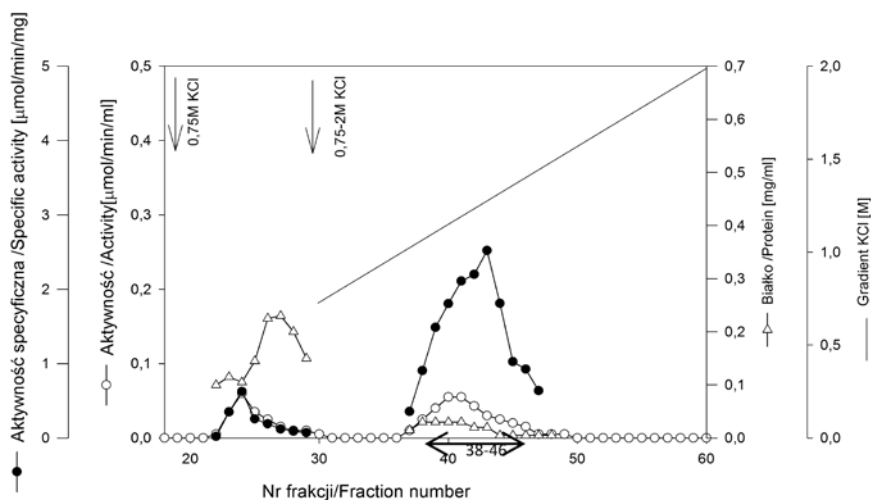
The results represent the mean values (±SD) of five independent preparative runs. Values in the table showed no significant differences, $p > 0,05$.



Ryc. 1. Chromatografia na kolumnie z fosfofelulozą. A – deaminaza AMP serca płodu; B – deaminaza AMP serca noworodka; C – deaminaza AMP serca człowieka dorosłego

Fig. 1. Chromatography on a phosphocellulose column. A – AMP-deaminase from the human fetus heart; B – AMP-deaminase from the human neonate heart; C – AMP-deaminase from the human mature heart

C)



gradientem stężeń tej soli i bardziej aktywny, reprezentował enzym nie zdegradowany lub nieznacznie zdegradowany.

Tabela II przedstawia wartości parametrów kinetycznych reakcji katalizowanej przez deaminazę AMP serca ludzkiego, w badanych okresach ontogenezy, pomierzone w nieobecności i w obecności najważniejszych modulatorów jego aktywności. Jak to wynika z tabeli II, w nieobecności efektorów allosterycznych wartości stałej półwysycenia ($S_{0,5}$) wyliczone dla enzymu wyizolowanego z serca płodu i noworodka były istotnie niższe ($p < 0,001$) od wartości tej stałej wyliczonej dla enzymu wyizolowanego z serca człowieka dorosłego. Obecność efektorów allosterycznych (ATP, ADP, ortofosforan) modyfikowała w poszczególnych grupach głównie wartość stałej półwysycenia, wpływając na szybkość maksymalną reakcji jedynie nieznacznie. W przypadku enzymu wyizolowanego z serca noworodka, szybkość maksymalna reakcji katalizowanej przez deaminazę AMP przewyższała znacząco ($p < 0,001$), niezależnie od braku czy też obecności efektorów allosterycznych, wartości tego parametru wyznaczone dla enzymu pochodzącego z serca ludzkiego w innych okresach ontogenezy.

DYSKUSJA

Cechą charakterystyczną metabolizmu serca jest duży dobowy obrót energii oraz konieczność stałej, niezakłóconej regeneracji zużywającego się ATP [2]. W prawidłowo ukrwionym mięśniu sercowym resynteza ATP przebiega sprawnie i polega na fosforylacji ADP przy udziale energii uwolnionej podczas procesów utleniania kwasów tłuszczowych i glukozy. W pracującym sercu degradacja i regeneracja ATP są ze sobą ściśle sprzężone, a wytwarzany podczas reakcji miokinazowej AMP może ulegać następnie deaminacji do IMP, w reakcji katalizowanej przez deaminazę AMP, albo też defosforylacji do adenozyiny, w reakcji katalizowanej przez

Tabela II. Deaminaza AMP serca ludzkiego w różnych okresach rozwoju osobniczego człowieka – wpływ efektorów allosterycznych na wartości liczbowe parametrów kinetycznych reakcji

Table II. Human heart AMP-deaminase in ontogenesis – regulatory effect of important allosteric effectors

| Dodany efektor Effector added | $S_{0,5}$ [mM] | | | V_{max} [mmol/min/mg białka] [mmol/min/mg of protein] | | |
|----------------------------------|---------------------|-------------------|-----------------------------|---|------------------------------|--------------------|
| | Grupa wiekowa / Age | | | | | |
| | I | II | III | I | II | III |
| Brak efektora Control | 6,5 ^I | 6,6 ^{II} | 9,6 ^{IIwzgl I,II*} | 2,6 ^I | 4,6 ^{IIwzgl I,III*} | 2,5 ^{III} |
| ATP | 0,9 | 1,2 | 1,0 | 2,5 ^I | 4,9 ^{IIwzgl I,III*} | 2,5 ^{III} |
| ADP | 2,7 | 2,3 | 2,2 | 2,6 ^{Iwzgl III**} | 4,4 ^{IIwzgl I,III*} | 2,0 ^{III} |
| Pi Orthophosphate | 14,3 | 8,2 | 12,2 | 2,5 ^I | 3,7 ^{IIwzgl I,III*} | 2,4 ^{III} |

I – enzym wyizolowany z serca płodu, II – enzym wyizolowany z serca noworodka, III – enzym wyizolowany z serca dorosłego człowieka. Wartości SD nie przekraczały 10% wartości wyliczonych średnich. Statystyczna istotność różnic została wykazana: w nieobecności efektorów dla stałej półwysycenia $S_{0,5}$ ^{IIwzgl I,II*} $p < 0,001$ oraz porównując wartości szybkości maksymalnej reakcji v_{max} enzymu okresu noworodkowego w stosunku do pozostałych grup v_{max} ^{IIwzgl I,III*} $p < 0,001$ oraz v_{max} ^{Iwzgl III**} $p < 0,05$.

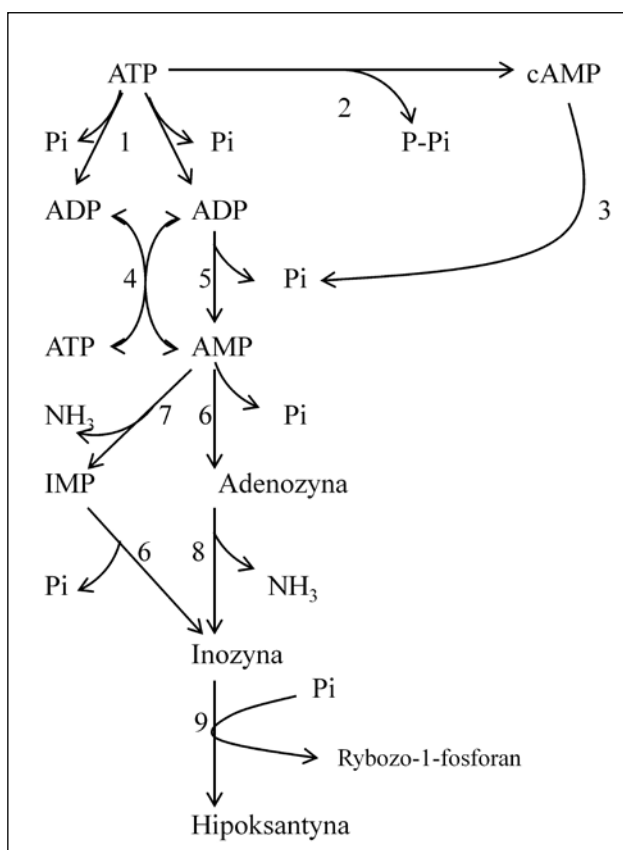
I – enzyme from the fetus heart, II – enzyme from the neonate heart, III – enzyme from the mature heart. SD values did not exceed $\pm 10\%$ of the calculated values. Statistical significance of differences when compared $S_{0,5}$ – half saturation constant in the absence of effectors $S_{0,5}$ ^{IIwzgl I,II*} $p < 0,001$ and when compared v_{max} – maximum velocity of reaction between neonatal and other groups v_{max} ^{IIwzgl I,III*} $p < 0,001$ oraz v_{max} ^{Iwzgl III**} $p < 0,05$.

5'-nukleotydzę. Rozmiar degradacji komórkowego AMP z udziałem każdej z dwóch dróg katabolicznych jest różny u poszczególnych gatunków ssaków i zależy od zróżnicowanej ekspresji genów kodujących wymienione enzymy, prezentowanych przez nie właściwości kinetyczno-regulacyjnych oraz aktualnego stężenia substratów i efektorów (ryc. 2).

W sercu szczura katabolizm AMP przebiega głównie z udziałem 5'-nukleotydu, zaś w sercu świnki morskiej, głównie z udziałem deaminazy AMP [5,10]. W sercu człowieka, udział obydwu enzymów degradujących AMP wydaje się być bardziej równoprawny, jednak w warunkach niedokrwienia defosforylacja AMP zdaje się nad deaminacją tego związku przeważać.

Jak to wynika z przedstawionych na rycinie 1 rozdzielów chromatograficznych, elucja deaminazy AMP, wyizolowanej z serca noworodka (ryc. 1B), w porównaniu z enzymem wyizolowanym z serca płodu (ryc. 1A) oraz serca człowieka dorosłego (ryc. 1C), prezentując podobny profil przebiegała jednak odmiennie. Uwolniona z podłoża aktywność specyficzna enzymu była nie tylko wyższa, ale także uwalniała się ona z kolumny przy wyższych stężeniach KCl (frakcje 48-57), aniżeli enzym „sercowy” w dwu pozostałych okresach ontogenezy.

Właściwości kinetyczno-regulacyjne wszystkich badanych form rozwojowych deaminazy AMP, charakteryzowała sigmoidalna kinetyka wysycenia enzymu substratem. W każdym przypadku zaobserwować było można wyraźny, aktywujący wpływ ATP i ADP oraz hamujący wpływ ortofosforanu. Widocznym znakiem silnie aktywującego działania ATP i ADP była hi-



Ryc. 2. Metabolizm nukleotydów purynowych w sercu (według Żydowo M. [11]). Enzymy: 1 – ATP-azy, 2 – cyklaza adenylanowa, 3 – fosfodiesteraza, 4 – miokinaza, 5 – fosfataza, 6 – 5'-nukleotydaza, 7 – deaminaza AMP, 8 – deaminaza adenozyzny, 9 – fosforylaza nukleozydowa puryn

Fig. 2. Purine nucleotide metabolism in the heart (according to Żydowo M. [11]). Enzymes: 1 – ATP-ases, 2 – Adenylate cyclase, 3 – Phosphodiesterase, 4 – Myokinase, 5 – Phosphatase, 6 – 5'Nucleotidase, 7 – AMP-deaminase, 8 – Adenosine deaminase, 9 – Purine nucleotide phosphorylase

perbolizacja krzywej kinetycznej połączona ze spadkiem wartości stałej półwysycenia (tabela II). W obecności ortofosforanu widoczne było natomiast pogłębienie sigmoidalnego charakteru krzywej kinetycznej i równoczesny wzrost wartości stałej półwysycenia (tabela II).

Przedstawione w pracy wyniki badań wskazują wyraźnie, że w trakcie ontogenezy człowieka, w jej okresie noworodkowym deaminaza AMP staje się bardziej aktywna oraz zmienia swoją podatność na oddziaływanie efektorów allosterycznych. Przedstawione powyżej odmienności chromatograficzne i kinetyczne enzymu serca noworodka sugerują, że w tym okresie rozwoju osobniczego człowieka, podobnie jak to obserwowano w przypadku deaminazy AMP z mięśnia szkieletowego człowieka [3], deaminaza AMP może zmieniać swój skład izozymowy.

WNIOSKI

Przedstawione wyniki badań wskazują, że w ontogenezie człowieka, w mięśniu sercowym, podobnie jak w mięśniu szkieletowym, dochodzi najpewniej do zmian w składzie izozymowym deaminazy AMP. Najwyższa aktywność specyficzna deaminazy AMP w sercu ludzkim wydaje się przypadać na okres noworodkowy ontogenezy. Czy ma to związek ze zmieniającymi się w tym okresie powszechnie, wymogami metabolizmu tkankowego pozostaje sprawą otwartą.

PIŚMIENNICTWO

1. Chaney A. L., Marbach E. P.: Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clin. Chem.* 1962, 8, 130. – 2. Chodorowski Z., Rybakowska I., Sein Anand J., Kaletha K.: Metabolizm energetyczny niewydolnego serca. *Przegl. Lek.* 2009, 66, 6, 356. – 3. Kaletha K., Nowak G.: Developmental forms of human skeletal-muscle AMP deaminase. The kinetic and regulatory properties of the enzyme. *Biochem J.* 1988, 249, 1, 255. – 4. Kaletha K., Składanowski A., Bogdanowicz S., Żydowo M.: Purification and some regulatory properties of human heart adenylate deaminase. *Int. J. Biochem.* 1979, 10, 11, 925. – 5. Kochan Z., Smoleński R.T., Yacoub M.H., Seymour A.L.: Nucleotide and adenosine metabolism in different cell types of human and rat heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1994, 26, 11, 1497. – 6. Lowenstein J.M.: Ammonia production in muscle and other tissues: the purine nucleotide cycle. *Physiol. Rev.* 1972, 52, 2, 382. – 7. Morisaki T., Sabina R.L., Holmes E.W.: Adenylate deaminase. A multigene family in humans and rats. *J. Biol. Chem.* 1990, 265, 20, 11482. – 8. Nowak G., Kaletha K.: Molecular forms of human heart muscle AMP deaminase. *Biochem. Med. Metab. Biol.* 1991, 46, 2, 263. – 9. Ogasawara N., Goto H., Yamada Y., Watanabe T.: Distribution of AMP-deaminase isozymes in rat tissues. *Eur. J. Biochem.* 1978, 87, 2, 297. – 10. Van Belle H., Wynants J., Goossens F.: Formation and release of nucleosides in the ischemic myocardium. Is the guinea-pig the exception? *Basic Res. Cardiol.* 1985, 80, 6, 653.
11. Żydowo M.: Adenine compounds and the heart. *Int. J. Biochem.* 1976, 7, 8, 353.

I. Rybakowska, M. Stępińska, M. Krzyżanowski, G. Szreder, S. Bakuła, K. Kaletha

HUMAN HEART AMP-DEAMINASE IN ONTOGENESIS

Summary

In human ontogenesis the isozymic pattern of skeletal muscle AMP-deaminase changes. The experimental results presented here suggest that the same may concern the heart muscle of human.

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