Ann. Acad. Med. Gedan., 2007, 37, 45–51

KRYSTIAN KALETHA[1], MARIE THEBAULT[2], JEAN-PAUL RAFFIN[3],
IWONA RYBAKOWSKA[1], JERZY KLIMEK[4]

DEAMINAZA AMP MIĘŚNIA SERCOWEGO RYBY CHRZĘSTNOSZKIELETOWEJ

AMP-DEAMINASE FROM CARDIAC MUSCLE OF ELASMOBRANCH FISH

[1]Zakład Biochemii i Fizjologii Klinicznej AM w Gdańsku
kierownik: prof. dr Krystian Kaletha
[2]Uniwersytet Bretanii Zachodniej, Plouzane, Francja
[3]Laboratorium Badania Środowiska Morskiego, Brest, Francja
[4]Katedra i Zakład Biochemii Farmaceutycznej AM w Gdańsku
kierownik: prof. dr Jerzy Klimek

W przedstawianej pracy opisano niektóre właściwości fizykochemiczne deaminazy AMP oczyszczonej z mięśnia sercowego ryby chrzęstnoszkieletowej – raja ciernista (Raja clavata). W nieobecności efektorów allosterycznych, oczyszczony enzym wykazywał hiperboliczną kinetykę wysycenia substratem z wartością stałej półwysycenia ($S_{0.5}$) około 1,7 mM. Milimolowe stężenie di- i trifosfonukleotydów adeninowych (ATP i ADP) stymulowały aktywność oczyszczonego enzymu, podczas gdy nieorganiczny fosforan (Pi) aktywność tę hamował. Regulacyjny wpływ wymienionych efektorów był znaczący i polegał w głównej mierze na modyfikacji wartości liczbowej stałej półwysycenia. W przeciwieństwie do nukleotydów adeninowych, milimolowe stężenie trifosfonukleotydu guaninowego (GTP), oprócz stałej półwysycenia, modyfikowało także szybkość maksymalną (V_{max}) katalizowanej reakcji enzymatycznej. Elektroforeza oczyszczonego enzymu na żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) wykazała obecność fragmentów białkowych o zbliżonej masie (70 i 80 kDa), odpowiadających najpewniej podjednostkom składowym enzymu. Opisane właściwości fizyko-chemiczne oczyszczonego enzymu przypominają bardzo te opisane uprzednio dla deaminazy AMP wyizolowanej z mięśnia sercowego ryby kostnoszkieletowej, sugerując podobieństwo strukturalne kodujących je genów.

Deaminaza AMP (AMP-aminohydrolaza, EC 3.5.4.6) katalizuje reakcję hydrolitycznej deaminacji kwasu adenylowego (AMP) do kwasu inozynowego (IMP). Fizjologiczna rola enzymu związana jest głównie z regulacją wartości ładunku energetycznego adenylanów (ŁEA) oraz regulacją pojemności puli nukleotydów purynowych w tkankach ssaków [3].

Izozymy deaminazy AMP u człowieka i szczura [11], kodowane są przez rodzinę trzech niezależnych genów [10]. Deaminaza AMP obecna w mięśniu szkieletowym ssaków, (w tym człowieka i szczura) jest szczególnie aktywna [9]. Wynika to nie tylko ze specyficznych właściwości kinetyczno-regulacyjnych enzymu mięśniowego, ale także z wysokiego poziomu ekspresji genu *ampd1* kodującego izozym mięśniowy w tej tkance [15]. W mięśniu sercowym ssaków (także człowieka i szczura) aktywność deaminazy AMP jest znacznie niższa [5, 6] i wynika głównie z niskiego poziomu ekspresji genu *ampd1*. W mięśniu sercowym szczura i człowieka poza genem *ampd1* ma również miejsce niewielka ekspresja pozostałych genów *(ampd2, ampd3)* kodujących deaminazę AMP [9, 14].

Informacji na temat ekspresji genu(ów) kodującego(ych) deaminazę AMP w mięśniach szkieletowym i sercowym ryb dotąd nie opublikowano. W mięśniu sercowym ryby kostnoszkieletowej (pstrąg tęczowy – Salmo gairdneri), aktywność deaminazy AMP, choć kilkukrotnie niższa aniżeli w mięśniu szkieletowym, jest jednak (w porównaniu z mięśniem sercowym ssaków) stosunkowo wysoka [7, 15]. Niezależnie od tego, wyizolowany z serca tej ryby enzym posiada bardzo podobny do enzymu wyizolowanego z mięśni szkieletowych, profil regulacyjny [7]. Podobieństwo powyższe może wskazywać na wspólne genetyczne źródło wymienionych enzymów.

MATERIAŁY I METODY

Zwierzęta

Ryby chrzęstnoszkieletowe (Raja ciernista) były odławiane w wodach Kanału Angielskiego i następnie hodowane w basenach o temperaturze wody utrzymywanej w zakresie 10–13 °C. Po uśmierceniu ryby przez dekapitację, wypreparowane serce przemywano wodą destylowaną i natychmiast zamrażano w ciekłym azocie. Dla celów preparatywnych gromadzono serca pozyskane z około 10–15 ryb.

Opisane w pracy doświadczenia zostały przeprowadzone na materiale tkankowym pochodzącym z ryb odłowionych w okresie zimowym (styczeń, luty).

Odczynniki

5'-AMP (typ V, z mięśnia szkieletowego konia), ADP, ATP (sól sodowa) i GTP (sól litu) firmy Sigma (St. Louis, USA); fosfoceluloza firmy Whatman (Maidstone, UK). Żel poliakrylamidowy oraz standardy firmy Pharmacia Fine Chemicals (Uppsala, Szwecja). Pozostałe odczynniki pochodziły z firmy Merck (Damstadt, Niemcy).

Procedura oczyszczania

Serca rybie (ważące około 5-8 g) homogenizowano w trzech objętościach (v/w) buforu ekstrakcyjnego (0,18 M KCl, 0,054 M KH_2PO_4, 0,035 M KH_2PO_4; pH 6,5), w homogenizatorze Ultra-Turax, przy maksymalnych obrotach, dwukrotnie przez okres 30 sekund. Otrzymany homogenat mieszano przez 1 godzinę w temperaturze około 4 °C, a następnie wirowano przez 30 min przy 18000xg. Przygotowany supernatant mieszano z 2–3 g uprzednio zrównoważonej fosfocelulozy, a następnie otrzymaną zawiesinę mieszano przez 1 godzinę w temperaturze 4 °C, przemywając ją dwukrotnie 25 ml buforu ekstrakcyjnego. Następnie zawiesinę fosfocelulozy wlewano do kolumny szklanej (1 x 20 cm), po czym ponownie przemywano

25 ml 0,4 M KCl, pH 7,0. Następnie zaadsorbowany na fosfocelulozie enzym eluowano 1,5 M roztworem KCl, pH 7,0, zbierając frakcje o objętości 1,5 ml [7]. Szybkość wypływu eluatu z kolumny wynosiła 20 ml/godzinę.

W wyniku zastosowanej procedury preparatywnej otrzymywano ponad stukrotnie oczyszczony enzym, wolny od aktywności deaminazy adenozyny. Aktywność specyficzna otrzymanego preparatu enzymatycznego (mierzona w 10 mM stężeniu substratu) wynosiła około 25 μM/min na mg białka.

Oznaczanie aktywności oraz właściwości kinetycznych enzymu

W niskim, 70 μM stężeniu substratu, pomiar reakcji enzymatycznej prowadzono metodą spektrofotometryczną Kalckar'a [4]. Objętość mieszaniny reagującej, zawierającej 0,1 M bufor bursztynianowy, pH 6,5 oraz rozpuszczony w nim substrat (AMP) wynosiła 1 ml.

W wyższych, milimolowych stężeniach substratu, pomiar reakcji enzymatycznej prowadzono metodą fenolowo-podchlorynową Chaney'a i Marbach'a [2]. Mieszanina inkubacyjna, w objętości końcowej 0,5 ml zawierała 0,1 M bufor bursztynianowy, pH 6,5, efektory (1 mM ATP, 1 mM ADP, 1 mM GTP lub 2,5 mM ortofosforan) oraz wzięty w jednym z dziewięciu stężeń (0,2 – 12,8 mM) substrat.

Parametry kinetyczne reakcji enzymatycznej (szybkość maksymalna - Vmax; stała półwysycenia – $S_{0.5}$; współczynnik kooperatywności – n_H) wyliczano wedle metodyki opisanej w uprzedniej pracy [7].

Elektroforeza na żelu poliakrylamidowym

Elektroforezę na żelu poliakrylamidowym przeprowadzano na 10% żelu, w obecności 0,04 M Tris-u, 0,02 M octanu sodu, 2 mM EDTA i 0,2% SDS-u. Próbki gotowano przez 5–10 min, w 100 °C, w buforze zawierającym 2,5% SDS i 5% merkaptoetanol. Elektroforezę przeprowadzano przez 10 min przy napięciu prądu 150 V, a następnie proces kontynuowano przy napięciu 150 V, dopóki czoło migrujących białek nie osiągało końca żelu [12]. Jako standardów używano białek wzorcowych firmy Pharmacia.

Oznaczanie stężenia białka

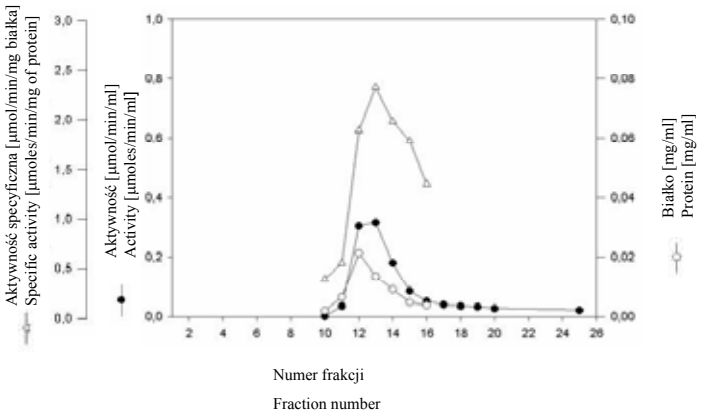
Stężenie białka w homogenacie oznaczano metodą Lowry'ego, zaś w roztworach enzymatycznych metodą Bradforda [1], używając albuminy surowiczej jako standardu.

WYNIKI I DYSKUSJA

Aktywność deaminazy AMP w mięśniu sercowym ryby chrzęstnoszkieletowej (Raja clavata) wynosiła około 0,2 μmol/min na miligram białka i nie różniła się znacząco od tej znajdowanej w mięśniu sercowym ryby kostnoszkieletowej [7].

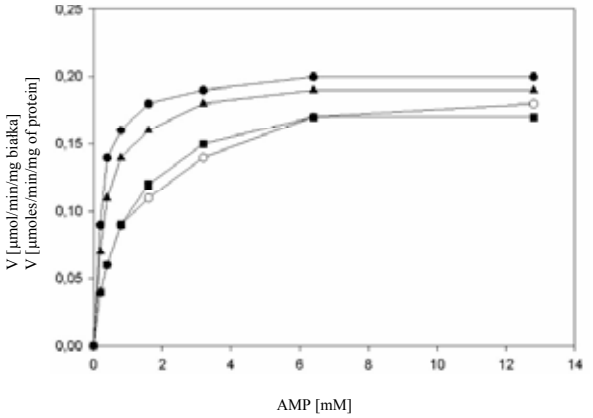
Rycina 1 przedstawia profil elucji na kolumnie z fosfocelulozą deaminazy AMP wyizolowanej z mięśnia sercowego ryby chrzęstnoszkieletowej. Jak to wynika z przedstawionej ryciny, zaadsorbowany na fosfocelulozie enzym wypływał z kolumny w postaci pojedynczego, dobrze skorelowanego z wypływającym białkiem szczytu aktywności, przypominając bardzo podobny w tym względzie profil elucji enzymu wyizolowanego z serca ryby kostnoszkieletowej [7]. W niskim (70 μM) stężeniu substratu (wynik nie przedstawiony w pracy), deaminaza AMP

wykazywała najwyższą aktywność w przedziale pH 6,6–6,8. W wysokim (10 mM) stężeniu substratu (wynik nie przedstawiony w pracy), optimum pH nie było tak wyraźnie zaznaczone, a najwyższą aktywność enzymu obserwowano w przedziale pH 6,4–7,2. Podobne zależności zmian aktywności od zmian pH zaobserwowano uprzednio również dla enzymu wyizolowanego z mięśnia sercowego ryby kostnoszkieletowej [7].



Ryc. 1. Profil elucji deaminazy AMP mięśnia sercowego ryby chrzęstnoszkieletowej na kolumnie z fosfocelulozą. Frakcje 12–14 zlano i używano do doświadczeń

Fig. 1. Elution profile of Thornback ray cardiac muscle AMP-deaminase from a phosphocellulose column. Fractions 12–14 were pooled and used for further experiments



Ryc. 2. Wpływ stężenia substratu na szybkość reakcji katalizowanej przez deaminazę AMP mięśnia sercowego ryby chrzęstnoszkieletowej w obecności i nieobecności efektorów allosterycznych. Reakcję mierzono w warunkach kontrolnych (○) oraz w obecności 1 mM ATP(●), 1 mM ADP (▲) lub 1 mM GTP (■)

Fig. 2. Effect of substrate concentration on velocity of the reaction catalyzed by Thornback ray cardiac muscle AMP-deaminase. Reaction measured at control conditions (○) and with additions of 1 mM ATP(●), 1 mM ADP (▲) and 1 mM GTP (■)

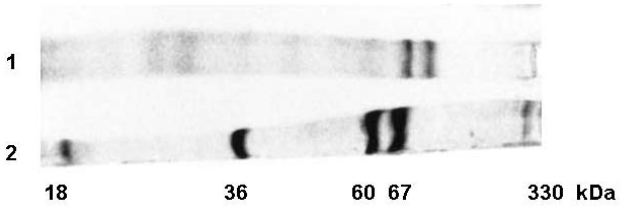
Tab. I

Deaminaza AMP mięśnia sercowego ryby chrzęstnoszkieletowej - właściwości regulacyjne enzymu
Thornback ray cardiac muscle AMP-deaminase – regulatory effects of some important allosteric effectors

Efektor Effector added	*$S_{0.5}$ (mM)	V_{max} (% kontroli) (% of the control)
Brak (kontrola) None (control)	1,7	100
1 mM ATP	0,2	102
1 mM ADP	0,3	96
1 mM GTP	0,8	78
2,5 mM Pi	2,0	106

Wyniki są średnią z trzech niezależnych doświadczeń. *Odchylenia nie przekraczały 10% średniej wartości.
The data represent the mean of three independent experiments. *Calculated S.E. values did not exceed 10% of the mean value.

Wyniki badań przedstawione na rycinie 2 oraz w tabeli I prezentują właściwości kinetyczno-regulacyjne deaminazy AMP wyizolowanej z serca ryby chrzęstnoszkieletowej. Jak to wynika z danych przedstawionych na rycinie 2, wszystkie wykreślone krzywe kinetyczne prezentowały hiperboliczny, lub bardzo zbliżony do niego, profil kinetyczny. Obecne w stężeniu jednomilimolowym nukleotydy adeninowe (ATP lub ADP), silnie stymulowały reakcję katalizowaną przez deaminazę AMP, powodując znaczący spadek wartości wyjściowej (1,7 mM) stałej półwysycenia do wartości około 0,2 mM (w obecności 1mM ATP) lub 0,3 mM (w obecności 1mM ADP) (tabela I). W obecności 1 mM nukleotydu guaninowego (GTP), spadek wartości wyjściowej stałej półwysycenia był widoczny, lecz nie tak wyraźny jak w przypadku nukleotydów adeninowych (tabela I). W przeciwieństwie do nukleotydów purynowych, obecny w stężeniu 2,5 mM ortofosforan wartość wyjściową stałej półwysycenia nieznacznie podwyższył (tabela I), zmieniając kształt kinetycznej krzywej wysyceniowej z hiperbolicznego na sigmoidalny (wynik nie przedstawiony na rycinie 2).



Ryc. 3. Elektroforeza SDS-PAG deaminazy AMP mięśnia sercowego ryby chrzęstnoszkieletowej. Standardy białka: tyreoglobulina (330 kDa), albumina (67 kDa), katalaza (60 kDa), dehydrogenaza kwasu mlekowego (36 kDa) i ferrytyna (18 kDa) – ścieżka 2. Oczyszczony enzym – ścieżka 1

Fig. 3. SDS-PAG electrophoresis of Thornback ray cardiac muscle AMP-deaminase. Thyreoglobulin (330 kDa), albumin (67 kDa), catalase (60 kDa), lactic dehydrogenase (36 kDa) and ferritin (18 kDa) were used as standards (line 2). Line 1- purified enzyme

Rycina 3, ilustrująca wynik badania elektroforetycznego, ujawniła obecność na żelu poliakrylamidowym dwóch fragmentów białkowych usytuowanych w sąsiedztwie standardu albuminy (67 kDa). Wspomniane fragmenty białka posiadały zbliżoną masę cząsteczkową (72 i 79 kDa) i prezentowały najpewniej podjednostki składowe enzymu sercowego [14].

Opisane powyżej właściwości regulacyjne deaminazy AMP mięśnia sercowego ryby chrzęstnoszkieletowej przypominają te opisane dla enzymu wyizolowanego z mięśnia szkieletowego tej ryby [8]. Przypominają one również właściwości fizykochemiczne deaminazy AMP wyizolowanej z mięśnia sercowego ryby kostnoszkieletowej (pstrąga tęczowego – Salmo gairdneri) [7].

Zaobserwowane podobieństwa właściwości fizykochemicznych prezentowane przez deaminazę AMP wyizolowaną z mięśni (sercowego i szkieletowego) ryb chrzęstnoszkieletowych i kostnoszkieletowych są bardzo znaczące i sugerują wspólne genetyczne pochodzenie enzymu „mięśniowego" u ryb.

PODZIĘKOWANIA
Badania te były finansowane przez Akademię Medyczną w Gdańsku (W-186, W-104, W-922).

PIŚMIENNICTWO

1. Bradford M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 1976, 72, 248. – 2. Chaney A.L., Marbach E.P.: Modified reagents for determination of urea and ammonia. Clin. Chem. 1962, 8, 130. – 3. Chapman A.G., Atkinson D.E.: Stabilization of the adenylate energy charge by the adenylate deaminase reaction. J. Biol. Chem. 1973, 248, 8309. – 4. Kalckar H.M.: Differential spectrophotometry of purine compounds by means of specific enzymes. III. Studies of the enzymes of purine metabolism. J. Biol. Chem. 1947, 167, 461. – 5. Kaletha K., Składanowski A.: Regulatory properties of rat heart AMP deaminase. Biochim. Biophys. Acta 1979, 568, 80. – 6. Kaletha K., Składanowski A., Bogdanowicz S., Żydowo M.: Purification and some regulatory properties of human heart adenylate deaminase. Int. J. Biochem. 1979, 10, 925. – 7. Kaletha K., Thebault M., Raffin J.P.: Comparative studies on heart and skeletal muscle AMP-deaminase from Rainbow trout (Salmo Gairdneri). Comp. Biochem. Physiol. 1991, 99B, 751. – 8. Makarewicz W.: AMP-aminohydrolase in muscle of elasmobranch fish. Purification procedure and properties of the purified enzyme. Comp. Biochem.Physiol. 1969, 29, 1. – 9. Makarewicz W., Stankiewicz A.: AMP-aminohydrolase of human skeletal muscle: partial purification and properties. Biochem. Med. 1974, 10, 180.

10. Morisaki T., Sabina RL., Holmes E.W.: Adenylate deaminase: a multigene family in humans and rats. J. Biol. Chem. 1990, 265, 11482. – 11. Ogasawara N., Goto H., Yamada Y., Watanabe T., Asano T.: AMP deaminase isozymes in human tissues. Biochim. Biophys. Acta 1982, 714, 298. – 12. Raffin J.P., Thebault M.T.: Purification and partial characterization of an AMP deaminase from the marine invertebrate Palaemon serratus. Comp. Biochem. Physiol. 1987, 88B, 1071. – 13. Ronca-Testoni S., Raggi A., Ronca G.: Muscle AMP-aminohydrolase 3. A comparative study on the regulatory properties of skeletal muscle enzyme from various species. . Biochim. Biophys. Acta 1970, 198, 101. – 14. Sabina R.L., Morisaki T., Clarke P., Eddy R., Shows T.B., Morton C.C., Holmes E.W.: Characterization of the human and rat myoadenylate deaminase genes. J. Biol. Chem. 1990, 265, 9423. – 15. Thebault M.T., Izem L., Leroy J.P., Gobin E., Charrier G., Raffin J.P.: AMP-deaminase in elasmobranch fish: a comparative histochemical and enzymatic study. Comp. Biochem. Physiol. B 2005, 141, 4, 472.

K. Kaletha, M. Thebault, J.P. Raffin, I. Rybakowska, J. Klimek

AMP-DEAMINASE FROM CARDIAC MUSCLE OF ELASMOBRANCH FISH

Summary

AMP-deaminase from the cardiac muscle of an elasmobranch fish-Thornback ray *(Raja clavata)* was isolated and physico-chemical properties of the purified enzyme were investigated. At optimum pH (6.6), and in the absence of regulatory ligands (control conditions), AMP-deaminase showed a hyperbolic substrate-saturation kinetics, with half-saturation constant ($S_{0.5}$) value being about 1.7 mM. Adenine nucleotides (ATP and ADP) activated, while orthophosphate inhibited the activity of Thornback ray fish cardiac muscle AMP-deaminase, influencing mainly the value of $S_{0.5}$ constant. In contrast to the above, guanine nucleotide (GTP) influenced the enzyme in a more complex way influencing both $S_{0.5}$ and V_{max} values of the reaction. SDS-PAG electrophoresis of Thornback ray fish cardiac muscle AMP-deaminase revealed the presence of two protein fragments of approximate molecular size of 70 and 80 kDa respectively, representing probably different subunit species of the enzyme. Properties of elasmobranch fish Thornback ray cardiac muscle AMP-deaminase presented here were compared with these of teleost fish Raibow trout cardiac muscle AMP-deaminase described previously. The experimental data described here suggest that one gene is responsible for coding AMP-deaminase in the muscles of both elasmobranch and teleost fish.

Adres: prof. dr Krystian Kaletha
Zakład Biochemii i Fizjologii Klinicznej AMG
ul. Dębinki 1, 80-211 Gdańsk
e-mail: kaletakj@mediclub.pl
tel./fax 58 349-14-65