

ANNA ŚWIECA-MAĆKOWSKA¹, MAŁGORZATA ŚWIĄTKOWSKA-FREUND²,
JERZY KLIMEK³, KRYSZTIAN KALETHA¹

KATABOLIZM NUKLEOTYDÓW ADENINOWYCH W ŁOŻYSKU LUDZKIM

CATABOLISM OF ADENINE NUCLEOSIDES IN HUMAN PLACENTA

¹Zakład Biochemii i Fizjologii Klinicznej AM w Gdańsku

kierownik: prof. dr Krystian Kaletha

²Klinika Położnictwa AM w Gdańsku

kierownik: dr hab. Krzysztof Preis, prof. nzw.

³Katedra i Zakład Biochemii Farmaceutycznej AM w Gdańsku

kierownik: prof. dr Jerzy Klimek

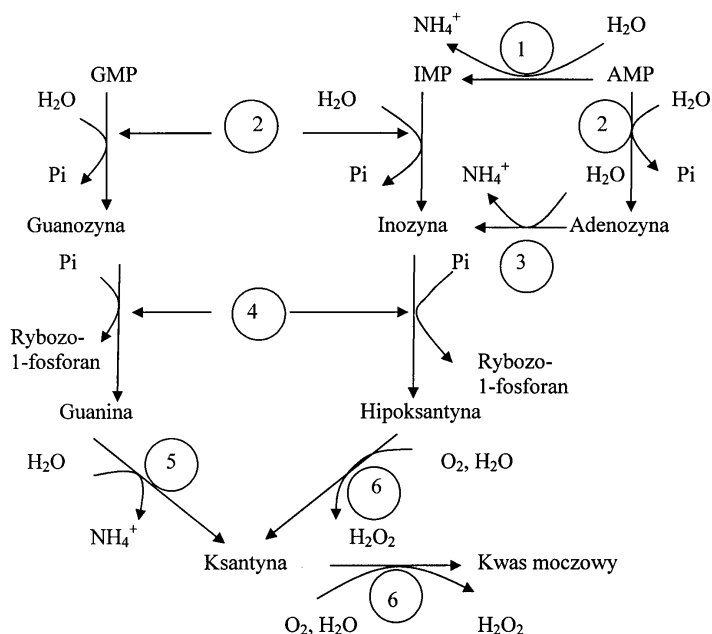
5'-nukleotyda (EC 3.1.3.6) defosforyluje niecykliczne monofosforany nukleozydów do nukleozydów i fosforanu nieorganicznego. Obecnie opisano siedem ludzkich izoform 5'-nukleotydu o różnej dystrybucji tkankowej.

Deaminaza AMP (EC 3.5.4.6) katalizuje deaminację AMP do IMP i w tkankach ssaków występuje w różnych formach molekularnych.

Izoforma 5'-nukleotydu i deaminazy AMP obecna w łożysku ludzkim wykazuje podobny profil regulacyjny. To wskazuje na ich wpływ na regulację degradacji ATP w łożysku ludzkim.

Łożysko ssaków jest narządem rozwijającym się w macicy od momentu zagnieżdżenia zarodka aż do trzydziestego szóstego tygodnia ciąży. Rolę funkcjonalną zaczyna pełnić już w trzecim miesiącu ciąży [3]. Pośrednicząc w wymianie substancji pomiędzy matką a płodem łożysko posiada dobrze rozbudowany system krążenia składający się z dwu niezależnych układów: płodowego i matczyne. Krew matki od krwi płodu oddzielają trzy warstwy tkanek (syncytiotrofoblast, tkanka łączna oraz śródbłonek naczyniowy kosmka) tworzące tak zwaną barierę łożyskową [3].

W łożysku, podobnie jak w innych tkankach, amoniak jako produkt degradacji kwasu adenylowego, powstawać może (ryc. 1) bądź to bezpośrednio, w wyniku jego deaminacji (reakcja katalizowana przez deaminazę AMP – reakcja 1), bądź też pośrednio, w wyniku deaminacji (reakcja 3) uprzednio wytworzonej adenozyiny (reakcja defosforylacji AMP katalizowana przez 5'-nukleotydu – reakcja 2).



Ryc. 1. Metabolizm nukleotydów purynowych w tkankach człowieka. 1 – deaminaza AMP (EC 3.5.4.6); 2 – 5'-nukleotydaza (EC 3.1.3.5); 3 – deaminaza adenozyzny (EC 3.5.4.4); 4 – fosforylaza nukleozydu purynowego (EC 2.4.2.1); 5 – guanaza (EC 3.5.4.3); 6 – oksydaza ksantynowa (EC 1.2.3.2)

Fig. 1. Metabolism of purine nucleotides in human tissues. 1 – AMP deaminase (EC 3.5.4.6); 2 – 5'-nucleotidase (EC 3.1.3.5); 3 – adenosine deaminase (EC 3.5.4.4); 4 – purine nucleoside phosphorylase (EC 2.4.2.1); 5 – guanine (EC 3.5.4.3); 6 – xanthine oxidase (EC 1.2.3.2)

5'-nukleotydaza (5'NT) (EC 3.1.3.5) rozkłada niecykliczne nukleotydy 5'-monofosforanowe do odpowiednich nukleozydów i fosforanu nieorganicznego i występuje w organizmach ssaków w postaci szeregu odmian molekularnych, różniących się właściwościami fizykochemicznymi oraz lokalizacją subkomórkową. Obecnie znanych jest siedem odmian molekularnych 5'-nukleotydyazy (tab. I). Pięć z nich znajduje się w cytozolu (cN-IA i cN-IB, cN-II i cN-III, oraz cdN), pozostałe w błonie cytoplazmatycznej (eN) lub macierzy mitochondrialnej (mdN) [1, 2].

5'-nukleotydaza błonowa (eN) zakotwiczona jest do zewnętrznej powierzchni błony cytoplazmatycznej łańcuchem glikozylofosfatydyloinozitolowym (GPI). Występuje powszechnie w tkankach i narządach ssaków, wykazując szeroką specyficzność substratową. Substratami preferowanymi przez ten enzym są AMP oraz IMP, a wartości K_m dla tych substratów są niskie i leżą w zakresie stężeń mikromolowych. Dla ekto-5'-nukleotydyazy pochodzącej z łożyska ludzkiego wartości K_m dla AMP i IMP wynoszą odpowiednio 15 μM i 30 μM . Enzym łożyskowy wykazuje optimum aktywności w pH 7,4 – 9,0, a ATP, ADP oraz fosforan nieorganiczny hamują aktywność enzymu w sposób kompetycyjny (ATP, ADP), bądź niekompetycyjny (fosforan nieorganiczny). W trakcie rutynowego przygotowywania homogenatów tkankowych, niemal połowa aktywności ekto-5'-nukleotydyazy oddysocjuje z błony cytoplazmatycznej do śród-

Tab. I

Izoformy 5'-nukleotydu

Isoforms of 5'-nucleotidase

Izoforma 5'NT Isoform of 5'NT	Pełna nazwa zwyczajowa enzymu oraz symbol kodującego genu Full name of the enzyme	Inne nazwy zwyczajowe (synonimy) Aliases
eN	Ekto-5'-nukleotydu; NT5E	Ekto-5'-NT; eNT; „low K_m ” AMP specyficzna 5'-NT
cN-IA	Cytozolowa 5'-nukleotydu IA; NT5C1A	cN-I; „high K_m ” AMP-specyficzna 5'-NT
cN-IB	Cytozolowa 5'-nukleotydu IB; NT5C1B	homolog cN-IA
cN-II	Cytozolowa 5'-nukleotydu II; NT5C2	„high K_m ” IMP specyficzna 5'-NT
cN-III	Cytozolowa 5'-nukleotydu III; NT5C3	PN-I; P5'N-1
cdN	Cytozolowa 5'(3')-deoksynukleotydu; NT5C	PN-II; dNT-1
mdN	Mitochondrialna 5'(3')-deoksynukleotydu; NT5M	dNT-2

wiska inkubacyjnego, pozorując istnienie izoformy cytoplazmatycznej. Jeszcze do niedawna frakcję „cytoplazmatyczną” eN klasyfikowano jako niezależną izoformę enzymu błonowego o nazwie nukleotydu eNs, lub cytoplazmatyczną „low K_m ” 5'-nukleotydu [11].

5'-nukleotydu cytozolowa IA (cN-IA), zwana także „preferującą” AMP, „high K_m ” nukleotydu – występuje głównie w mięśniach szkieletowych i mięśniu sercowym. Jej odmiana homologiczna – 5'-nukleotydu IB (cN-IB), występuje w jądrach. Substratem preferowanym przez nukleotydu cN-I jest AMP, a wartość K_m dla tego związku leży w zakresie stężeń milimolowych. Dla enzymu rekombinowanego wartość K_m dla AMP wynosi 1,9 mM. Nukleotydu cN-I dla ujawnienia pełnej aktywności wymaga obecności kationów dwuwartościowych (Mg^{2+} , Mn^{2+} lub Co^{2+}). ADP oraz GTP (lecz nie ATP) silnie enzym aktywują. W obecności mikromolowych stężeń ADP K_m enzymu dla AMP i IMP przyjmuje wartości mikromolowe. Spadek komórkowego stężenia ATP oraz towarzyszący temu spadkowi wzrost stężenia ADP wydają się być głównymi czynnikami, które aktywują enzym w warunkach fizjologicznych. Powszechnie uznawana rola, jaką nukleotydu cN-IA pełni w metabolizmie niedokrwionego mięśnia sercowego wynika z syntezy adenozyne, którą enzym ten katalizuje. W łożysku ludzkim izoforma ta jest nieobecna i defosforylacja AMP przebiega przy udziale innej izoformy 5'-nukleotydu.

5'-nukleotydu cytozolowa II (cN-II) zwana także „preferującą” IMP, „high K_m ” nukleotydu jest izoformą występującą powszechnie w tkankach zwierzęcych, odpowiedzialną za regulację wewnątrzkomórkowego stężenia IMP oraz GTP. Optimum aktywności enzymu przypada na pH 6,5 – 9,5. Nukleotydu cN-II rozkłada IMP kilkanaście razy szybciej aniżeli AMP, a krzywa wysycenia enzymu przez IMP ma profil hiperboliczny, zaś przez AMP profil sigmoidalny. Wartości K_m enzymu dla wymienionych substratów leżą w zakresie dziesiętnych części milimola (dla IMP), lub kilku – kilkunastu milimoli (dla AMP) [11]. Milimolowe

stężenia ATP oraz ADP modyfikują właściwości kinetyczne enzymu zwiększając znacząco szybkość maksymalną reakcji oraz powinowactwo do IMP oraz AMP. Fosforan nieorganiczny aktywność enzymu hamuje, zmieniając równocześnie profil wysycenia enzymu przez IMP z hiperbolicznego na sigmoidalny.

Cytozolowa 5'-nukleotyduaza III (cN-III) katalizuje defosforylację mononukleotydów głównie pirymidynowych. Preferowanym substratem dla tego enzymu jest CMP. Enzym występuje przede wszystkim w krwinkach czerwonych, gdzie uczestniczy w degradacji RNA dojrzewających erytrocytów [2].

W łożysku ludzkim, pozyskanym drogą cesarskiego cięcia, tuż przed rozpoczęciem akcji porodowej, adenozyina jest obecna jedynie w ilościach śladowych (4 nM/g tkanki). Po zakończeniu porodu (odbytego drogą naturalną) ilości adenozyiny znajdowane w łożysku są już jednak znaczące i wynoszą około 230 nM/g tkanki [7]. Adenozyina obecna w łożysku świeżo „urodzonym” powstaje najpewniej w wyniku zwiększonej degradacji ATP, wywołanej okołoporodowymi skurczami macicy i związanym z tym niedokrwieniem przestrzeni wewnątrz-kosmowych łożyska.

Jak wspomniano uprzednio, izoforma cytoplazmatyczna cN-II 5'-nukleotyduazy, dla której kwas inozynowy (IMP) jest substratem preferowanym, rozkłada również kwas adenylowy (AMP). Powinowactwo tego enzymu do AMP jest jednak niewielkie i wartość stałej Michaelisa dla tego związku (K_m 1 – 15 mM) odbiega wyraźnie od stężeń AMP znajdujących się w komórce (0,03 – 0,2 mM). Z tego też powodu udział izoformy cN-II w defosforylacji wewnątrzkomórkowego AMP wydaje się być wątpliwy. Wątpliwości te mogą się jednak okazać bezzasadne, jeżeli weźmiemy pod uwagę rozmiary aktywującego wpływu ATP oraz ADP. Obserwowana w obecności tych nukleotydów aktywacja cN-II jest tak znacząca, że defosforylacja AMP przez ten enzym w warunkach zarówno wysokich (wysokie stężenie ATP), jak i obniżonych (niskie stężenie ATP, wysokie stężenia ADP i AMP) wartości potencjału energetycznego komórki może okazać się metabolicznie istotna.

Drugim, oprócz 5'-nukleotyduazy cN-II, enzymem, który w degradacji wewnątrzkomórkowego AMP wydaje się odgrywać istotną rolę, jest deaminaza AMP.

Deaminaza AMP (EC 3.5.4.6) jest enzymem katalizującym reakcję hydrolytycznej deaminacji kwasu adenylowego (5'-AMP) do kwasu inozynowego (IMP). Znaczenie metaboliczne deaminacji kwasu adenylowego w tkankach ustrojowych związane jest głównie z regulacją zasobów energetycznych komórki oraz regulacją pojemności puli nukleotydów adeninowych [4]. Zasoby energetyczne komórki określa, tzw. ładunek energetyczny adenylanów ŁEA, opisujący wzajemny stosunek stężeń ufosforylowanych nukleotydów adeninowych.

$$\text{ŁEA} = \frac{[\text{ATP}] + \frac{1}{2} [\text{ADP}]}{[\text{ATP}] + [\text{ADP}] + [\text{AMP}]}$$

Ryc. 2. Ładunek energetyczny adenylanów

Fig. 2. Adenylate energy charge

W warunkach fizjologicznych wartość liczbowa tego ładunku zmienia się w wąskim zakresie (0,85 – 0,95), co jest wyrazem właściwego metabolizmu energetycznego komórki. W utrzymaniu prawidłowych wartości ŁEA z deaminazą AMP współdziała kinaza adenylanowa

(EC 2.7.4.3) przekształcająca dwie cząsteczki ADP w cząsteczkę ATP oraz AMP. Deaminacja wytworzonego w reakcji kinazowej AMP przesuwa równowagę tej reakcji w prawo podtrzymując w ten sposób syntezę ATP.

Za ekspresją deaminazy AMP tkankach człowieka, odpowiada rodzina trzech, niezależnych genów [6], syntetyzujących odpowiednio izozymy: mięśniowy (M), wątrobowy (L), oraz dwa erytrocytarne (E1, E2). Izozym wątrobowy kodowany przez gen AMPD2 jest także obecny w łożysku ludzkim.

Deaminację kwasu adenylogowego w łożysku ludzkim wykazano dopiero na początku lat siedemdziesiątych [5]. Znaleziona w homogenacie tkankowym łożyska aktywność deaminazy AMP była jednak bardzo niska i odbiegała znacząco od aktywności znajdowanej w homogenacie mięśnia szkieletowego. Późniejsze badania prowadzone na oczyszczonym enzymie wykazały, że deaminaza AMP obecna w łożysku ludzkim jest aktywowana przez ATP i ADP oraz hamowana przez fosforan nieorganiczny. Obecnie wiadomo, że występująca w łożysku ludzkim deaminaza AMP jest immunologicznie identyczna lub bardzo podobna do enzymu wyizolowanego z wątroby ludzkiej [9, 10], zaś profil regulacyjny enzymu łożyskowego przypomina profil regulacyjny łożyskowej 5'-nukleotydyazy (izofromy cN-II).

Obecność w łożysku ludzkim 5'-nukleotydyazy oraz deaminazy AMP, jak również podobieństwo ich profili regulacyjnych (aktywujący wpływ ATP i ADP, oraz inhibujący wpływ fosforanu nieorganicznego) [8] wskazuje na skoordynowany udział obydwu tych enzymów w degradacji nukleotydów adeninowych w łożysku ludzkim. Zmieniające się podczas dojrzewania łożyska wewnątrzkomórkowe stężenia efektorów (ATP, ADP i ortofosforanu) oraz substratu (AMP), modulując aktywności deaminazy AMP oraz 5'-nukleotydyazy wydają się zapewniać skuteczną, dostosowaną do aktualnych potrzeb, regulację wewnątrzkomórkowej degradacji ATP w tym narzędziu.

PIŚMIENNICTWO

1. Bianchi V., Spychała J.: Mammalian 5'-nucleotidases. *J. Biol. Chem.* 2003, 278, 46195-46198. – 2. Borowiec A., Lechward K., Tkacz-Stachowska K., Składanowski A.C.: Adenosine as a metabolic regulator of tissue function: production of adenosine by cytoplasmic 5'-nucleotidases. *Acta Biochim. Pol.* 2006, 53, 269-278. – 3. Larsen W.J.: *Human embryology*. 3 ed. 2001, Philadelphia: Churchill Livingstone, 2001. – 4. Lowenstein J.M.: Ammonia production in muscle and other tissues: the purine nucleotide cycle. *Physiol. Rev.* 1972, 52, 382-414. – 5. Makarewicz W., Maćkowiak E.: Adenosine-5'-monophosphate aminohydrolase of human placenta. *Acta Biochim. Pol.* 1971, 18, 135-142. – 6. Morisaki T., Sabina R.L., Holmes E.W.: Adenylate deaminase: a multigene family in human and rats. *J. Biol. Chem.* 1990, 265, 11482-11486. – 7. Sim M.K., Maguire M.H.: Presence of adenosine in the human term placenta. Determination of adenosine content and pathways of adenosine metabolism. *Circ. Res.* 1972, 31, 779-788. – 8. Spychała J., Madrid-Marina V., Fox I.H.: High Km soluble 5'-nucleotidase from human placenta. Properties and allosteric regulation by IMP and ATP. *J. Biol. Chem.* 1988, 263, 18759-18765. – 9. Szydłowska M., Nagel-Starczynowska G., Rybakowska I., Świeca A., Kaletha K.: Human liver AMP-deaminase – oligomeric forms of the enzyme. *Mol. Cell Biochem.* 2002, 241, 81-86. – 10. Świeca A., Rybakowska I., Nagel-Starczynowska G., Kossowska E., Kaletha K.: AMP-deaminase from human term placenta. *Mol. Cell Biochem.* 2003, 252, 363-367. – 11. Zimmermann H.: 5'-nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *Biochem. J.* 1992, 285, 345-350.

A. Świeca-Maćkowska, M. Świątkowska-Freund, J. Klimek, K. Kaletha

CATABOLISM OF ADENINE NUCLEOSIDES IN HUMAN PLACENTA

Summary

5'-nucleotidases (EC 3.1.3.6) dephosphorylate non-cyclic nucleoside monophosphates to nucleosides and inorganic phosphate. Seven human 5'-nucleotidases isoforms with different subcellular localization have been described so far.

AMP deaminase (EC 3.5.4.6) catalyzes deamination of AMP to IMP and exists in various molecular forms in mammalian tissues.

The isoform of 5'-nucleotidase and AMP deaminase present in the human placenta manifest similar regulatory profiles. This suggests they coordinate control in the regulation of ATP degradation in the human placenta.

Adres: prof. dr Krystian Kaletha
Zakład Biochemii i Fizjologii Klinicznej AMG
ul. Dębinki 1, 80-210 Gdańsk
e-mail: iwonar@amg.gda.pl
tel. 58-349-14-71