

Anna Maria Roszkowska

**WPLYW ZMIAN STEZENIA JONÓW WODOROWYCH
I POTASOWYCH NA WŁAŚCIWOŚCI KINETYCZNO-
REGULACYJNE DEAMINAZY AMP ŁOŻYSKA LUDZKIEGO**

**Rozprawa doktorska została wykonana
w Zakładzie Biochemii i Fizjologii Klinicznej
Akademii Medycznej w Gdańsku**

Promotor:

Prof. dr hab. Krystian Kaletha

Gdańsk 2009

Moim Najbliższym z podziękowaniami

**Dziękuję Profesorowi Krystianowi Kaletha
oraz Koleżankom i Kolegom
z Katedry Biochemii i Biochemii Farmaceutycznej
za okazaną pomoc.**

SPIS TREŚCI

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	6
1. WSTĘP	8
2. CEL PRACY	16
3. MATERIAŁ I ODCZYNNIKI	17
3.1 Materiał tkankowy.....	17
3.2 Odczynniki chemiczne (złoża chromatograficzne, wzorce masowe, enzymy, inhibitory proteolizy i inne).....	17
3.3 Oligonukleotydy.....	19
3.4 Bufory oraz inne roztwory.....	20
4. METODY	25
4.1 Izolacja i oczyszczanie deaminazy AMP z dojrzałego łożyska ludzkiego.....	25
4.1.1 przygotowanie homogenatu tkankowego.....	25
4.1.2 przygotowanie fosfocelulozy dla związania enzymu.....	25
4.1.3 wiązanie i chromatografia enzymu na fosfocelulozie P-11.....	26
4.1.4 rechromatografia enzymu na fosfocelulozie P-11.....	27
4.2 Oznaczanie aktywności enzymu.....	27
4.3 Oznaczanie stężenia białka.....	28
4.4 Wyznaczanie optymalnych stężeń jonów wodorowych i potasowych....	28
4.5 Wyznaczanie parametrów kinetycznych reakcji enzymatycznej.....	28
4.6 Elektroforeza na żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE).....	29
4.7 Filtracja żelowa na kolumnie z Sepharozą CL-6B.....	30
4.8 Miareczkowanie grup sulfhydrylowych enzymu.....	31
4.9 Izolacja całkowitego komórkowego RNA.....	32
4.10 Elektroforeza agarozowa RNA.....	32
4.11 Przygotowanie RNA wolnego od DNA.....	33
4.12 Odwrotna transkrypcja.....	33
4.13 Optymalizacja warunków reakcji PCR pozwalająca na powielenie cDNA <i>AMPD1</i> , <i>AMPD2</i> , <i>AMPD3</i> oraz <i>CN-1</i>	34
4.14 Elektroforeza agarozowa DNA.....	34

4.15 Analiza densytometryczna.....	35
5. WYNIKI.....	36
5.1 Ekspresja genów deaminazy AMP oraz cytozolowej 5'-nukleotydazy-1 w łożysku ludzkim.....	36
5.2 Oczyszczanie deaminazy AMP z łożyska ludzkiego.....	38
5.3 Właściwości fizyko – chemiczne enzymu „świeżego”.....	41
5.3.1 Rozdział elektroforetyczny.....	41
5.3.2 Właściwości kinetyczno – regulacyjne.....	42
5.3.3 Pomiar reaktywnych grup sulfhydrylowych.....	48
5.3.4 Wyznaczenie form agregacyjnych	49
5.4 Właściwości fizyko – chemiczne enzymu „przechowywanego”.....	52
5.4.1 Rozdział elektroforetyczny.....	52
5.4.2 Właściwości kinetyczno – regulacyjne.....	53
5.4.3 Pomiar reaktywnych grup sulfhydrylowych.....	59
6. DYSKUSJA.....	60
7. WNIOSKI.....	65
8. STRESZCZENIE.....	66
9.PIŚMIENNICTWO.....	68

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

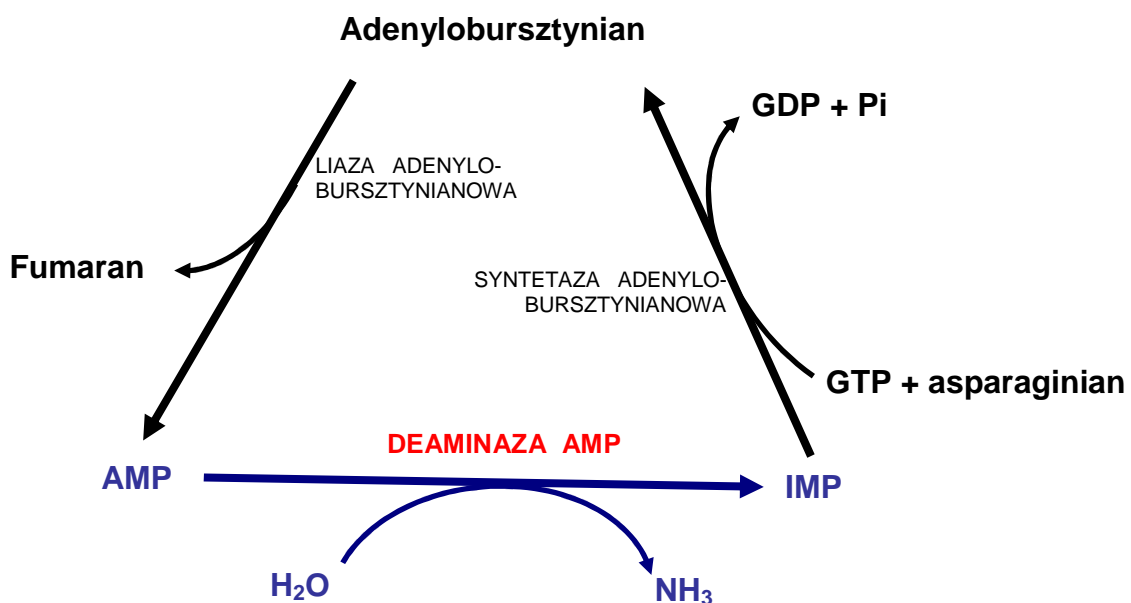
ADP	- adenozyno-5'-dwufosforan
AMP	- adenozyno-5'-monofosforan
AMPD	- deaminaza AMP
<i>AMPD1</i>	- gen kodujący ludzki izozym mięśniowy demianazy AMP
AMPD1	- izozym mięśniowy demianazy AMP
<i>AMPD2</i>	- gen kodujący ludzki izozym wątrobowy demianazy AMP
AMPD2	- izozym wątrobowy demianazy AMP
<i>AMPD3</i>	- gen kodujący ludzki izozym erytrocytarny demianazy AMP
AMPD3	- izozym erytrocytarny demianazy AMP
APS	- nadszarczan amonu
ATP	- adenozyno-5'-trójfosforan
cN-I	- cytozolowa 5'-nukleotydaza I
<i>CN-I</i>	- gen kodujący ludzką cytozolową 5'-nukleotydazę I
cN-II	- cytozolowa 5'-nukleotydaza II
cN-III	- cytozolowa 5'-nukleotydaza III
cd-N	- cytozolowa 5'(3')-deoksynukleotydaza
DNA	- kwas deoksyrybonukleinowy
DTNB	- kwas 5,5'-dwutio-bis(2-nitrobenzoesowy)
EDTA	- kwas etylenodiaminotetraoctowy
GTP	- guanozyno-5'-trójfosforan
IMP	- inozyno-5'-monofosforan
pz	- par zasad
kDa	- kilodalton, 1000 j.m.a.
ŁEA	- ładunek energetyczny adenylanów
n_H	- współczynnik Hill'a
PAGE	- elektroforeza białek na żelu poliakrylamidowym
PCR	- reakcja łańcuchowa polimerazy

Pi	- fosforan nieorganiczny
PMSF	- fluorek fenylometylosulfonylu
RNA	- kwas rybonukleinowy
$S_{0,5}$	- stała półwysycenia enzymu substratem
S.D.	- odchylenie standardowe
SDS	- siarczan dodecyłu
TEMED	- N,N,N',N'-tetraetylenodiamina
Tris	- tris(hydroksylmetyl)aminometan
V_{max}	- szybkość maksymalna reakcji

1. WSTĘP

Deaminaza AMP (AMPD, AMP-aminohydrolaza, EC 3.5.4.6.) jest enzymem cytoplazmatycznym, katalizującym nieodwracalną reakcję hydrolitycznej deaminacji kwasu adenyłowego (AMP) do kwasu inozynowego (IMP).

Najwyższą aktywność deaminazy AMP wykazano w mięśniu szkieletowym ssaków (1), gdzie stanowi ona element składowy cyklu nukleotydów purynowych (2) (Ryc.1). Przemiany tego cyklu obejmują ciąg reakcji katalizowanych przez deaminazę AMP, syntetazę adenylobursztynianową (EC 6.3.4.4.) oraz liazę adenylobursztynianową (EC 4.3.2.2.).



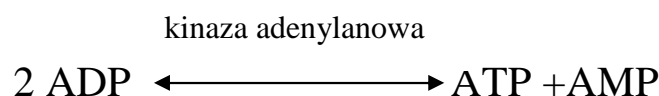
Ryc. 1. Cykl nukleotydów purynowych.

Cykl nukleotydów purynowych pełni w tkance mięśniowej rolę anaplerotyczną (3), uczestniczy w metabolizmie aminokwasów (2), a poprzez regulację mięśniowej glikolizy (4) i glikogenolizy (5) w metabolizmie energetycznym mięśni.

W tkankach, w których cykl nukleotydów purynowych nie funkcjonuje, np. mięśniu gładkim (6), mięśniu sercowym, nerkach czy łożysku (7,8), fizjologiczna rola pełniona przez deaminazę AMP wiąże się głównie ze stabilizacją tzw. ładunku energetycznego adenylanów (ŁEA) (9):

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

Utrzymanie prawidłowych wartości ładunku energetycznego adenylanów ma szczególne znaczenie w sytuacjach gwałtownego zapotrzebowania tkanek na energię, np. podczas intensywnej pracy mięśni (10). W wyniku działania kinazy adenylanowej (EC 2.7.4.3.) ATP zostaje wówczas częściowo zregenerowany poprzez przekształcenie dwóch cząsteczek ADP w cząsteczkę ATP i AMP.



Preferowany kierunek reakcji wymaga ciągłej degradacji AMP. Zapewnia ją deaminaza AMP, która deaminując kwas adenyłowy przesuwa równowagę reakcji kinazowej w kierunku syntezy ATP. Zabezpiecza to tkankę przed zbyt drastycznymi spadkami wartości ładunku energetycznego adenylanów (11).

Deaminaza AMP kodowana jest przez rodzinę trzech niezależnych genów, kodujących izozymy mięśniowy (*AMPD1*), wątrobowy (*AMPD2*) i erytrocytarny (*AMPD3*) (12,13).

Gen *AMPD1* zlokalizowany jest w chromosomie 1 i liczy 23 tysiące par zasad (13). U człowieka i szczura jego ekspresję obserwuje się niemal wyłącznie w mięśniu szkieletowym. Jedynie niewielkie ilości transkryptów *AMPD1* znaleziono także w płucach, nerkach i jelicie. W wyniku alternatywnego składania gen *AMPD1* produkuje dwa transkrypty pochodne, różniące się obecnością lub brakiem eksonu 2 (14,15).

Gen *AMPD3* umiejscowiony jest w chromosomie 11 i liczy 60 tysięcy par zasad. Poza erytrocytami ekspresję tego genu wykazano również w nerce, śledzionie, sercu (13), a także w wolno kurczących się mięśniach szkieletowych (16). Na matrycy genu *AMPD3* powstają co najmniej cztery transkrypty pochodne (1a, 1b, 1b-c i 1c), różniące się między sobą długością eksonu pierwszego (17). Ich wzajemne proporcje w poszczególnych tkankach są różne; w mięśniu szkieletowym dominuje transkrypt 1b.

Gen *AMPD2* umiejscowiony jest w chromosomie 1 i liczy jedynie 14 tysięcy par zasad. Jego ekspresja, największa w wątrobie i mózgu (12), obserwowana jest również w nerce, śledzionie i trzustce (18). Za ekspresję genu *AMPD2* odpowiadają dwa blisko siebie umiejscowione promotory. Pozwala to na lepszą kontrolę ekspresji genu *AMPD2*. W wyniku alternatywnego składania transkryptu pierwotnego, gen *AMPD2* produkuje trzy transkrypty pochodne (1A/2, 1B/2, 1B/3), różniące się odpowiednio obecnością lub brakiem eksonów 1A, 1B lub 2 (19).

W tkankach szczura (20) i człowieka (21) izozymy deaminazy AMP wykazują duże podobieństwo strukturalne. Najbardziej ewolucyjnie zachowaną częścią deaminazy AMP jest fragment C-końcowy, zawierający katalityczne centrum enzymu (13,22). Fragment N-końcowy enzymu jest natomiast zróżnicowany i zawiera domenę regulatorową (13,24), wyznaczającą jego wewnątrzkomórkową dystrybucję (23) oraz niektóre tkankowo specyficzne właściwości regulacyjne (13,16,25).

W 1987 roku sklonowano cDNA genu kodującego deaminazę AMP z mięśnia szkieletowego szczura (26), a niedługo potem również cDNA genów kodujących enzym w innych tkankach oraz narządach szczura i człowieka (13).

Deaminazę AMP wyizolowano po raz pierwszy z mięśnia szkieletowego królika w 1957 roku (27). Dziesięć lat później, po opracowaniu (28) prostszej i bardziej wydajnej metody izolacji enzymu, podjęto szczegółowe badania jego właściwości kinetycznych, regulacyjnych i strukturalnych. Stwierdzono wówczas, że wyizolowany z mięśnia szkieletowego królika, szczura i człowieka enzym jest białkiem regulatorowym o aktywności regulowanej przez homo- i heterotropowe oddziaływania substratu (29) oraz efekторы takie jak jednowartościowe jony (głównie potasu i sodu) (30,31), nieorganiczny fosforan oraz nukleotydy (ATP, ADP, GTP) (32-34). Regulacyjny wpływ tych ligandów modyfikowany jest przez pH środowiska, a także przez kontakt enzymu z białkami aparatu kurczliwego (35).

Na profil regulacyjny deaminazy AMP mięśnia szkieletowego w sposób wyraźny wpływa stężenie jonów potasowych oraz pH środowiska inkubacyjnego (30,36). W roku 1967 Smiley i Suelter (31) wykazali zależny od chlorku potasu, dwufazowy przebieg reakcji katalizowanej przez deaminazę AMP mięśnia szkieletowego królika. Hiperboliczna w 100 – 150 mM stężeniu KCl kinetyka reakcji, w nieobecności tej soli przekształcała się w kinetykę sigmoidalną. Badania późniejsze określiły zależności pomiędzy stężeniem jonów potasowych i pH środowiska a aktywnością enzymu, również dla deaminazy AMP mięśnia szkieletowego szczura i człowieka.

W optymalnym dla aktywności deaminazy AMP z mięśnia szkieletowego szczura pH 6,5, w niskich stężeniach substratu i chlorku potasu (< 20 mM), reakcja katalizowana przez enzym mięśniowy przebiegała wedle kinetyki sigmoidalnej (37-39). W stężeniach KCl powyżej 20 mM (39) sigmoidalna kinetyka reakcji zmieniała się w hiperboliczną i pozostawała taką nawet w wysokim (0,5 M) stężeniu tej soli. W pH lekko zasadowym (pH 7.1), inaczej

aniżeli w pH lekko kwaśnym (pH 6,5), reakcja katalizowana przez deaminazę AMP z mięśnia szkieletowego szczura pozostawała niezależna od stężeń KCl i prezentowała niezmiennie kinetykę sigmoidalną (32).

Poszukując optymalnego dla enzymu mięśniowego stężenia chlorku potasu wykazano, że oprócz pH środowiska inkubacyjnego zależy ono także od stężenia substratu, w którym reakcja enzymatyczna przebiega (40). Dla aktywności enzymu mięśniowego szczura (36) i człowieka (31), mierzonej w pH 6,5 oraz w niskich, mikromolowych stężeniach substratu, optymalne stężenie chlorku potasu wynosi około 150 mM. Dla aktywności enzymu mięśniowego królika (36) jest ono w tych samych warunkach nieco wyższe i wynosi około 200 mM. W pH bardziej kwaśnym (pH 5,9), aktywność deaminazy AMP mięśnia szkieletowego szczura, mierzona w mikromolowych stężeniach substratu, osiąga optimum już w 30 mM stężeniu chlorku potasu; w pH lekko zasadowym (pH 7,1) natomiast, dopiero w 200 mM stężeniu tej soli. W stężeniach KCl wyższych od 200 mM aktywność enzymu mięśniowego, mierzona w niskich i wysokich stężeniach substratu, zarówno w pH 6,5, jak i 7,1 ulega obniżeniu (41).

Deaminaza AMP wyizolowana z mięśnia szkieletowego ssaków (królika, szczura, człowieka) jest oligomerem zbudowanym z podjednostek o masie 70-80 kDa (30,42), którego aktywność oraz profil regulacyjny określone są poprzez zmiany w strukturze czwartorzędowej (efekt allosteryczny) oraz zmiany w stopniu zagregowania podjednostek enzymu. W nieobecności chlorku potasu, jedyną aktywną formą deaminazy AMP mięśnia szkieletowego szczura wydaje się być mało aktywny monomer (30,43). W rosnących stężeniach tej soli natomiast, zarówno w pH lekko kwaśnym, jak i obojętnym, enzym stopniowo agreguje, tworząc struktury dimeryczne i tetrameryczne. W pH bardziej zasadowym (pH 8,0) przeważają jednak tendencje dezagregacyjne i nawet w obecności chlorku potasu enzym dysocjuje na mało aktywne monomery (43). Modulując stopień agregacji mięśniowej deaminazy AMP, stężenia jonów

potasowych i wodorowych zmieniają zarówno aktywność, jak i strukturę enzymu.

W roku 1979 wykazano, że dodana do środowiska inkubacyjnego trypsyna, powodująca odłączenie od deaminazy AMP mięśnia szkieletowego królika niewielkiego (7 kDa) fragmentu peptydowego zmienia niektóre właściwości regulacyjne enzymu (44). Pozbawiony tego fragmentu enzym przestał być podatny na regulacyjne oddziaływanie ATP (44), a katalizowana przez niego reakcja już w niskich, milimolowych stężeniach chlorku potasu wykazywała kinetykę hiperboliczną. Utrata wspomnianego fragmentu białka nie wpływała jednak wyraźniej na funkcje katalityczne enzymu mięśniowego. Badania króliczej deaminazy AMP przechowywanej kilka dni w 4⁰C (45) wykazały, że po zajściu opisanej powyżej modyfikacji, przestała być ona podatna na dalszą proteolizę, a jej aktywność i obraz elektroforetyczny nie ulegały już zmianom w następnych dniach przechowywania.

Zmiany w pH środowiska inkubacyjnego miały także wpływ na liczbę reaktywnych grup sulfhydrylowych enzymu. Miareczkując deaminazę AMP mięśnia szkieletowego szczura kwasem 5,5'-dwutio-bis(2-nitrobenzoesowym) (DTNB) wykazano, że wzrost pH środowiska inkubacyjnego z 6,0 do 8,0 powiększył, przypadającą na mol enzymu, liczbę miareczkowalnych grup sulfhydrylowych z 7 do 12 (46,47). Natomiast enzym z zablokowanymi grupami sulfhydrylowymi zmieniając swą wrażliwość na chlorek potasu, prezentował kinetykę hiperboliczną już w bardzo niskich stężeniach tej soli (46).

Deaminaza AMP z tkanek innych niż mięsień szkieletowy stała się przedmiotem szczegółowych badań dopiero pod koniec lat siedemdziesiątych (48,49). Badania te wykazały wyraźną immunologiczną i kinetyczno – regulacyjną odmienność enzymu wątrobowego, nerkowego i łożyskowego od enzymu mięśniowego (7,50,51).

Deaminaza AMP wyizolowana z wątroby ludzkiej jest oligomerem zbudowanym z podjednostek o masie cząsteczkowej około 68 kDa (52).

W porównaniu z enzymem mięśniowym, aktywność wątrobowej deaminazy AMP regulowana jest w dużym stopniu przez nukleotydy purynowe (ATP, ADP i GTP) (53), w mniejszym zaś przez jony potasu oraz fosforan nieorganiczny (51,54). W nieobecności nukleotydów adeninowych, w środowisku lekko kwaśnym i obojętnym oraz w obecności 100 mM stężenia chlorku potasu, kinetyka reakcji katalizowanej przez enzym wątrobowy ma charakter wyraźnie sigmoidalny (53). Obecność ortofosforanu sigmoidalny charakter tej kinetyki nieco pogłębia, zaś obecność ATP i ADP wyraźnie ją hiperbolizuje (53). GTP na enzym wątrobowy wywiera działanie podwójne – w stężeniach niższych (<25 μ M) stymuluje enzym, zaś w stężeniach wyższych (>25 μ M) hamuje (55).

Enzym wątrobowy, podobnie jak deaminaza AMP z mięśnia szkieletowego, zależnie od pH środowiska, może być rozmaicie zagregowany (52). W pH optymalnym (pH 6,6) (53) deaminaza AMP wyizolowana z wątroby ludzkiej występuje głównie jako forma o masie cząsteczkowej około 360 – 400 kDa, zaś w pH obojętnym także w postaci form o masach cząsteczkowych około 140 i 280 kDa (52).

Aktywność oraz parametry kinetyczne deaminazy AMP wyizolowanej z wątroby ludzkiej zmieniają się podczas jej przechowywania. W trakcie tego procesu enzym traci aktywność, a jego podjednostki ulegają postępującej dezagregacji i/lub degradacji (56).

Deaminację kwasu adenyłowego w łożysku ludzkim, wbrew początkowym zaprzeczeniom (57), wykazano po raz pierwszy w roku 1971 (58). Wyizolowana z tej tkanki deaminaza AMP wykazywała sigmoidalną kinetykę wysycenia substratem w wysokim (0,1 M) stężeniu jonów potasu, a jej aktywność była silnie stymulowana przez ATP oraz hamowana przez ortofosforan (50).

W łożysku, podobnie jak w niektórych innych tkankach i narządach ludzkich, w katabolizmie AMP, obok deaminazy AMP brać może również udział 5'-nukleotydaza (5'-NT, EC 3.1.3.5.), defosforylująca AMP do

adenozyny (59). Spośród izozymów cytozolowych (cN-I, cN-II, cN-III i cdN) (60) tego enzymu, tylko izozym cN-I (zwany AMP-preferującym) ze względu na swe preferencje substratowe oraz właściwości kinetyczno-regulacyjne¹ może efektywnie uczestniczyć w wewnątrzkomórkowej degradacji kwasu adenyłowego. O poziomie ekspresji genu kodującego ten izozym w łożysku ludzkim wiadomo jednak niewiele. Wykonana parę lat temu techniką Northern blot analiza obecności mRNA, będącego produktem genu *CN-1*, nie wykazała jego obecności w łożysku ludzkim (61).

¹ Optimum pH aktywności cytozolowej 5'-nukleotydazy I zawarte jest w przedziale 6,8 – 7,0, a kinetyka katalizowanej przez nią reakcji w nieobecności efektorów ma charakter sigmoidalny (59). Enzym jest silnie aktywowany przez ADP i w mniejszym stopniu przez GTP oraz hamowany przez ortofosforan (59,61). ATP w stężeniach niższych (< 4 mM) nie wpływa na aktywność enzymu (62), zaś w stężeniach wyższych (> 4 mM) hamuje ją (63).

2. CEL PRACY

Oszacowanie poziomów ekspresji genów kodujących izozymy deaminazy AMP oraz genu *CN-1* kodującego cytozolowy izozym 5'-nukleotyduazy (cN-I) stanowiło pierwszy cel mojej pracy doktorskiej.

Drugim, zasadniczym jej celem było zbadanie wpływu stężeń jonów potasowych i wodorowych na właściwości kinetyczno-regulacyjne świeżo wyizolowanej i „przechowywanej” deaminazy AMP z łożyska ludzkiego.

3. MATERIAŁ I ODCZYNNIKI

3.1 Materiał tkankowy

Materiał tkankowy (pochodzący z Kliniki Położnictwa Akademii Medycznej w Gdańsku oraz Oddziału Położniczego Szpitala Wojewódzkiego w Gdańsku) stanowiły łożyska zdrowych kobiet, pozyskane podczas porodów fizjologicznych w 38-40 tygodniu ciąży.

Fragmenty tkanki pobierane do izolacji RNA natychmiast mrożono w ciekłym azocie i przechowywano w temperaturze -70°C . Fragmenty tkanki pobierane do preparatyki enzymu kilkakrotnie przepłukiwano 0,9% roztworem NaCl i po oczyszczeniu z błon przechowywano w temperaturze -20°C .

Przeprowadzone badania uzyskały zgodę Niezależnej Komisji Bioetycznej do Spraw Badań Naukowych (NKEBN/436/2004).

3.2 Odczynniki chemiczne (złoża chromatograficzne, wzorce masowe, enzymy, inhibitory proteolizy i inne)

- **złoża chromatograficzne:** fosforan celulozy P-11 (*Park Scientific Limited*, Wielka Brytania), Sepharoza CL- 6B (*Amersham Pharmacia Biotech*, Szwecja);

- **wzorce masowe:** do elektroforezy poliakrylamidowej (*Amersham Pharmacia Biotech*, Szwecja), do elektroforezy agarozowej (*MBI Fermentas*, Litwa), do filtracji żelowej (*Sigma*, USA), Reverse Transcription System, PCR Master Mix (*MBI Fermentas*, Litwa);

- **enzymy:** deaminaza AMP z mięśnia szkieletowego królika (*Sigma*, USA), polimeraza DNA *Taq 4*, odwrotna transkryptaza *M-MuLV*, deoksyrybonukleaza I (*MBI Fermentas*, Litwa);

- **inhibitory proteolizy:** 1 mM fluorek fenylometylosulfonylu (PMSF) (*Roche Molecular Biochemicals*, Niemcy), inhibitor trypsyny (1µg/ml) (*Sigma*, USA), inhibitor RNaz (*MBI Fermentas*, Litwa);

- **substrat i efekторы:** nukleotydy: 5'-AMP, ATP (sól sodowa), ADP (sól potasowa) (*Sigma*, USA);

- **składniki buforów:** wersenian dwusodowy (EDTA), Tris, glicerol, formaldehyd, fenol, chloroform, cytrynian sodu, octan sodu, rodanek guanidyny, siarczan amonu, chlorek sodu, chlorek magnezu (*Sigma*, USA), kwas solny, kwas fosforowy, kwas octowy, wodorotlenek sodowy, wodorotlenek potasowy, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , chlorek potasu (*POCH*, Polska), kakodylan sodu, kwas bursztynowy (*Serva*, Niemcy);

- **inne:** bromek etydyiny (*Sigma*, USA), Coomasie Brilliant Blue G-250, błękit bromofenolowy (*Serva*, Niemcy); alkohol metylowy, alkohol etylowy (*POCH*, Polska), TEMED (*Bio-Rad*, USA), β -merkaptoetanol (tioetanol), alkohol izopropylowy, DMPC, agaroza, DTNB (*Sigma*, USA); mieszanina akrylamidów do elektroforezy (*Kucharczyk T.L.*, Polska);

- woda czterokrotnie destylowana

3.3 Oligonukleotydy

3.3.1 dla deaminazy AMP:

Nr	Sekwencja	Zastosowanie
1.	5'-gCTTgCATgAACCAgAAACA-3'	Primer sensowny dla ludzkiej <i>AMPD1</i>
2.	5'-ATgCTggTACTTggCCTCC-3'	Primer antysensowny dla ludzkiej <i>AMPD1</i>
3.	5'-TACAAggAACAgggTgAggg-3'	Primer sensowny dla ludzkiej <i>AMPD2</i>
4.	5'-ACAgTgCTCATAcgggTgCT-3'	Primer antysensowny dla ludzkiej <i>AMPD2</i>
5.	5'-TgACAggACTgTggCAgAgA-3'	Primer sensowny dla ludzkiej <i>AMPD3</i>
6.	5'-CCgTggCTCTgAgTACTggT-3'	Primer antysensowny dla ludzkiej <i>AMPD3</i>
7.	5'-CCTCgCCTTTgCCgATCC-3'	Primer sensowny dla ludzkiej <i>β-aktyny</i>
8.	5'-ggATCTTCATgAggTAgTCAgTC-3'	Primer antysensowny dla ludzkiej <i>β-aktyny</i>

3.3.2 dla cytozolowej 5' - nukleotyduzy I:

Nr	Sekwencja	Zastosowanie
1.	5'-CCAAGATTTTCTACGACAACC-3'	Primer sensowny dla ludzkiej <i>cN-I</i>
2.	5'-CAACCTACCCAGTGCCTCCAG-3'	Primer antysensowny dla ludzkiej <i>cN-I</i>
3.	5'-CCTCgCCTTTgCCgATCC-3'	Primer sensowny dla ludzkiej <i>β-aktyny</i>
4.	5'-ggATCTTCATgAggTAgTCAgTC-3'	Primer antysensowny dla ludzkiej <i>β-aktyny</i>

3.4 Bufory oraz inne roztwory

- Bufory stosowane podczas izolacji enzymu oraz pomiarów aktywności i stężenia białka enzymatycznego.

Bufor ekstrakcyjny Smiley'a pH 6,5: 0,054 M KH_2PO_4

0,035 M K_2HPO_4

0,18 M KCl

1 mM merkaptoetanol

wszystkie składniki rozpuszczano, doprowadzano do pH 6,5 i uzupełniano wodą do 1 litra.

Roztwory KCl: 0,4 M, 0,75 M i 2 M zawierające 1 mM merkaptoetanol.

Bufor bursztynianowy pH 6,5: 0,1 M bursztynian sodu

1 mM merkaptoetanol

Mieszanina reakcyjna do pomiaru aktywności deaminazy AMP w eluacie:

0,05 M bufor bursztynianowy, pH 6,5

10 mM 5' AMP

Odczynnik fenolowy: 20 g fenolu

0,1 g nitroprusydku sodu

składniki rozpuszczano i dopełniano wodą do 1 litra.

Odczynnik podchlorynowy: 10 g NaOH

10,5 ml antyforminy

składniki rozpuszczano i dopełniano wodą do 1 litra.

Odczynnik Bradforda – stężony: 0,33 g Coomasie Brilliant Blue (G250)

33,33 ml 96% etanolu

dopełniano 85% kwasem fosforowym do 100 ml.

- Bufory stosowane do oznaczeń kinetycznych oraz oznaczeń liczby reaktywnych grup sulfhydrylowych.

Bufor kakodylanowy pH 7,0: 0,1 M kakodylan sodu

Bufor fosforanowy: 85 ml 0,7 M KH_2PO_4

915 ml 0,7 M K_2HPO_4

0.45 M KCl

składniki rozpuszczano, doprowadzano do pH 7,8 i dopełniano wodą do 2 litrów.

Mieszanina reakcyjna do pomiaru grup sulfhydrylowych:

0,7 mg białka enzymatycznego

50 μl 200 μM DTNB w buforze fosforanowym

całość uzupełniano buforem fosforanowym o pH 7,8 zawierającym 0,45 M KCl do objętości 1 ml.

- Bufory stosowane do elektroforezy poliakrylamidowej w środowisku denaturującym.

Bufor elektrodowy 10x stężony: 0,025 M Tris, pH 8.3

0,1% SDS

0,192 M glicyna

składniki rozpuszczano i dopełniano wodą do 1 litra.

Bufor lizujący 5x stężony: 1 ml 0,5 M Tris, pH 6,8

1,6 ml 10% SDS

1,6 ml glicerolu

0,4 ml β -merkaptoetanolu

0,4 ml 0,5% błękitu bromofenolowego

3 ml wody

Mieszaniny polimeryzujące:

- żel dolny (rozdzielający) 10%: 4 ml 30% mieszaniny akrylamidów

2,5 ml 1,5 M Tris, pH 8,8

100 μ l 10% SDS

100 μ l 10% APS

5 μ l TEMED

3,3 ml wody

- żel górny (zagęszczający) 5%: 670 μ l 30% mieszaniny akrylamidów

500 μ l 0,5 M Tris, pH 6,8

50 μ l 10% SDS

50 μ l 10% APS

8 μ l TEMED

2,7 ml wody

Roztwór barwiący żel: 125 ml metanolu

25 ml kwasu octowego

30 ml FAST Coomasie

dopełniano wodą do 100 ml.

Roztwór odbarwiający żel: 20 ml kwasu octowego

10 ml metanolu

dopełniano wodą do 100 ml.

- Bufory stosowane podczas izolacji RNA oraz elektroforezy agarozowej RNA i DNA.

Do wszystkich buforów stosowanych podczas izolacji RNA dodawano 10% roztwór DMPC w etanolu (2 ml roztworu DMPC na 1 litr buforu), pozostawiano na noc i następnie wyjąławiano w 121⁰C przez 20 minut.

Bufor denaturujący do izolacji RNA: 4 M GuSCN

25 mM cytrynian sodu

0,5% sarkozyl

0,1 M β -merkaptoetanol

Mieszanina fenol-chloroform (pH 7.0) do izolacji RNA: 25 ml fenolu

25 ml chloroformu

5x stężony bufor do elektroforezy agarozowej RNA: 100 mM MOPS, pH 7,0

40 mM octan sodu, pH 4,0

5 mM EDTA, pH 8,0

pH doprowadzano do 7,0 stężonym NaOH.

Żel agarozowy do elektroforezy RNA: 0,4 g agarozy

1,8 ml formaldehydu 30%

30,65 ml wody

8 ml 5x stężonego buforu do

elektroforezy agarozowej RNA

Bufor SB do próbek RNA: 1x stężony bufor do elektroforezy

50% formamid

2,2 M formaldehyd

dopełniano wodą do 5 ml, przesączano i przechowywano w temperaturze 4⁰C.

Bufor obciążający do próbek RNA: 50% glicerol

1 mM EDTA

błękit bromofenolowy

dopełniano wodą do 5 ml, przesączało i przechowywano w temperaturze -20°C.

10x stężony bufor TAE: 40 mM Tris-octan, pH 8,0

2 mM EDTA

Żel do elektroforezy DNA: 1 g agarozy

100 ml 1x stężonego TAE

2 µl bromku etydyny

Bufor obciążający do próbek DNA: 40% sacharoza w wodzie

0,25% błękit bromofenolowy

4. METODY

4.1 Izolacja i oczyszczanie deaminazy AMP z dojrzałego łożyska ludzkiego

Preparatykę enzymu przeprowadzano w temperaturze „zimnego pokoju” (4⁰C).

4.1.1 przygotowanie homogenatu tkankowego

Łožysko ludzkie wypłukiwano z krwi 0,9 % roztworem NaCl, oczyszczano z błon i po zeszkobaniu części kosmówkowej cięto na kawałki. Kawałki tkanki płukano ponownie 0,9 % roztworem NaCl, ważono, po czym trzykrotnie homogenizowano w trzech objętościach buforu ekstrakcyjnego Smiley’a (0,089 M bufor fosforanowy o pH 6,5, 0,18 M chlorek potasu, 1 mM 2-merkaptoetanol), zawierającego 1 mM fluorek fenylometylosulfonylu (PMSF) oraz inhibitor trypsyny (1 µg/ml). Po zhomogenizowaniu, całość mieszano przez godzinę na mieszadle magnetycznym w temperaturze 4⁰C, a następnie wirowano (wirówka MSE) przez 30 minut przy szybkości obrotów 3000 obr./min. Wytworzony osad odrzucano, a supernatant poddawano kolejnemu wirowaniu (wirówka K-24) przez 30 minut przy szybkości obrotów 13000 obr./min. Pozbawiony mitochondriów supernatant, sączono przez potrójną warstwę gazy, po czym wiązano z fosfocelulozą.

Próbki przesączu pozostawiano do przeprowadzenia elektroforezy.

4.1.2 przygotowanie fosfocelulozy dla związania enzymu

W celu związania enzymu złoże chromatograficzne (fosfoceluloza) przygotowywano według metody opracowanej przez Smiley’a

i współpracowników (28), z niewielkimi modyfikacjami (64). Odważoną ilość (10 g) fosfocelulozy zalewano 200 ml 0,5 M wodorotlenku potasu, mieszano i pozostawiano przez 5 minut dla uwolnienia obecnego w złożu amoniaku, po czym odwirowywano z szybkością 1000 obr./min. Otrzymany osad kilkakrotnie przepłukiwano wodą destylowaną i odwirowywano aż pH supernatantu osiągnęło wartość poniżej 10. Następnie do osadu fosfocelulozy dodawano 200 ml 0,5 M kwasu solnego i po zamieszaniu pozostawiano przez 5 minut, po czym kilkakrotnie przepłukiwano wodą destylowaną i odwirowywano, aż pH supernatantu osiągnęło wartość około 3. Następnie fosfocelulozę kilkakrotnie przepłukiwano 0,005 M roztworem EDTA, a potem buforem ekstrakcyjnym Smiley'a, aż pH supernatantu osiągnęło wartość 6,5. Przygotowane w ten sposób złożo używano do wiązania enzymu.

4.1.3 wiązanie i chromatografia enzymu na fosfocelulozie P-11

Do homogenatu z łożyska ludzkiego dodawano (w ilościach odpowiadających 5 gramom jej suchej masy) uprzednio zrównoważoną fosfocelulozę. Otrzymaną zawiesinę łagodnie mieszano przez 1 godzinę w zimnym pokoju, a następnie odwirowywano (wirówka MSE) przez 5 minut z szybkością 1000 obr./min. Otrzymany supernatant odrzucano, a osad zalewano buforem ekstrakcyjnym, mieszano i trzykrotnie płukano przez odwirowywanie. Do otrzymanego osadu dodawano 0,4 M KCl o pH 7,0 zawierającym 1 mM merkaptoetanol, po czym całość mieszano i odwirowywano.

Fosfocelulozę z zaadsorbowanym enzymem наносono na kolumnę chromatograficzną o wymiarach 2,6x20 cm, po czym płukano 0,75 M KCl o pH 7,0 zawierającym 1 mM merkaptoetanol. Zasadniczą frakcję enzymu eluowano 0,75 – 2,0 M gradientem KCl o pH 7,0 zawierającym 1 mM merkaptoetanol. Szybkość elucji z kolumny wynosiła około 7ml/h, zaś objętość zbieranych frakcji około 2,3 mililitra.

4.1.4 rechromatografia enzymu na fosfocelulozie P-11

Fracje najbardziej aktywne zlewano i następnie (w celu usunięcia nadmiaru jonów potasowych) poddawano godzinnej dializie w buforze ekstrakcyjnym Smiley'a. Do oddializowanego roztworu enzymatycznego dodawano niewielką (około 2,5 g) porcję uprzednio przygotowanej (4.1.2) fosfocelulozy, po czym otrzymaną zawiesinę łagodnie mieszano przez godzinę na mieszadle magnetycznym i następnie, po naniesieniu na kolumnę chromatograficzną, przepłukiwano 0,75 M KCl o pH 7,0 zawierającym 1 mM merkaptoetanol. Zaadsorbowany na fosfocelulozie enzym eluowano zawierającym 1 mM merkaptoetanol 2,0 M KCl o pH 7,0, zbierając frakcje o objętości około 1,2 mililitra.

4.2 Oznaczanie aktywności enzymu

Aktywność deaminazy AMP oznaczano w mieszaninie inkubacyjnej o łącznej objętości 0,5 ml, zawierającej 10 mM substrat (AMP) rozpuszczony w 0,1 M buforze bursztynianowym, pH 6,5. Próbki z mieszaniną inkubacyjną umieszczano w łaźni wodnej i po ustaleniu się temperatury (30⁰C) rozpoczynano reakcję dodaniem do każdej z nich 50 µl roztworu enzymu. Po upływie 15 minut reakcje przerywano dodając do każdej z próbek, kolejno 1 ml odczynnika fenolowego i 1 ml odczynnika podchlorynowego, po czym, w celu uwidocznienia barwy, próbki pozostawiano przez godzinę w cieplarni o temperaturze 45⁰C.

Aktywność deaminazy AMP oznaczano wedle metody Chaney'a i Marbacha (65), polegającej na reakcji amoniaku z fenolem i podchlorynem sodu w obecności nitroprusydku sodu (katalizator), powodującej wytworzenie niebieskiego indofenolu. Ilość wytworzonego indofenolu oznaczano kolorymetrycznie (kolorometr EPOLL-2) przy długości fali 620 nm, mierząc

absorbancję badanej próby wobec próby ślepej zawierającej 0,5 ml środowiska inkubacyjnego z dodatkiem 1 ml odczynnika fenolowego i 1 ml odczynnika podchlorynowego. Stężenie amoniaku w próbkach odczytywano z uprzednio sporządzonej krzywej wzorcowej.

4.3 Oznaczanie stężenia białka

Stężenie białka oznaczano metodą Bradforda (66) używając Coomasie Brilliant Blue jako barwnika. Do próbek zawierających 10 µl roztworu enzymu dodawano 1 ml odczynnika Coomasie i po upływie 10 minut mierzono w nich absorbancję (kolorymetr EPOLL-2) przy długości fali 578 nm wobec próby ślepej zawierającej 1 ml odczynnika Coomasie.

4.4 Wyznaczanie optymalnych stężeń jonów wodorowych i potasowych

Pomiary optimum pH przeprowadzano w 0,1 M buforze kakodylanowym, o pH z przedziału 5,6 - 7,2, zawierającym 2,5 mM AMP. Sporządzone mieszaniny o łącznej objętości 0,5 ml umieszczano w łaźni wodnej i po ustaleniu się temperatury (30⁰C) rozpoczynano reakcję dodaniem, w równych odstępach czasu, roztworu enzymu. Aktywność enzymu mierzono kolorymetrycznie w oparciu o opisaną wcześniej metodę Chaney'a i Marbacha (65).

Pomiary optymalnego stężenia jonów potasowych przeprowadzono w 0,1 M buforze kakodylanowym o pH 6,4 i 7,0, zawierającym 2,5 mM AMP oraz chlorek potasu w stężeniach: 100, 150, 200, 250 i 350 mM. Po ustaleniu się temperatury, do każdej próby o łącznej objętości 0,5 ml, dodawano roztwór enzymu. Aktywność enzymu mierzono kolorymetrycznie w oparciu o opisaną wcześniej metodę Chaney'a i Marbacha (65).

4.5 Wyznaczanie parametrów kinetycznych reakcji enzymatycznej

Pomiary kinetyczne przeprowadzano w środowisku inkubacyjnym, zawierającym substrat (AMP), w stężeniach z przedziału 0,4 - 51,2 mM, rozpuszczony w 0,1 M buforze kakodylanowym o pH 6,4 lub 7,0, zawierającym 100 mM lub 200 mM chlorek potasu. Niektóre pomiary przeprowadzano w obecności efektorów enzymu (1 mM ATP lub 2,5 mM ortofosforanu).

Aktywność enzymu mierzono kolorymetrycznie w oparciu o opisaną wcześniej metodę Chaney'a i Marbacha (65). Wartości parametrów kinetycznych (K_m , V_{max} , n_H) reakcji enzymatycznej obliczano korzystając z odpowiedniego programu komputerowego.

4.6 Elektroforeza na żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE)

Elektroforezę poliakrylamidową wykonano według metody Webera i współpracowników (67). Na wylany 4 % poliakrylamidowy żel rozdzielający (dolny) o pH 6,8, nanoszono 0,5 ml wody, uniemożliwiając kontakt żelu z tlenem, będącym inhibitorem polimeryzacji. Po spolimeryzowaniu dolnego żelu, usunięto wodę i wylano 10% żel poliakrylamidowy zagęszczający (górny), umieszczając w nim grzebień. Po zakończonej polimeryzacji żelu górnego i usunięciu grzebienia, do aparatu wylewano bufor elektrodowy, a w uformowane studzienki nakładano odpowiednio przygotowany roztwór enzymu, zawierający 6-8 mg białka.

Przygotowanie enzymu wyglądało następująco: objętość odsolonego, rechromatografowanego preparatu enzymatycznego rozpuszczano w jednej objętości buforu lizującego (0,25 M bufor Tris-HCl o pH 6,8 zawierający 40% sacharozę, 20% tioetanol i 8% SDS), po czym otrzymaną mieszaninę

inkubowano przez 5 minut w temperaturze 100⁰C, odwirowywano, a następnie próbki mieszaniny nakładano na żel.

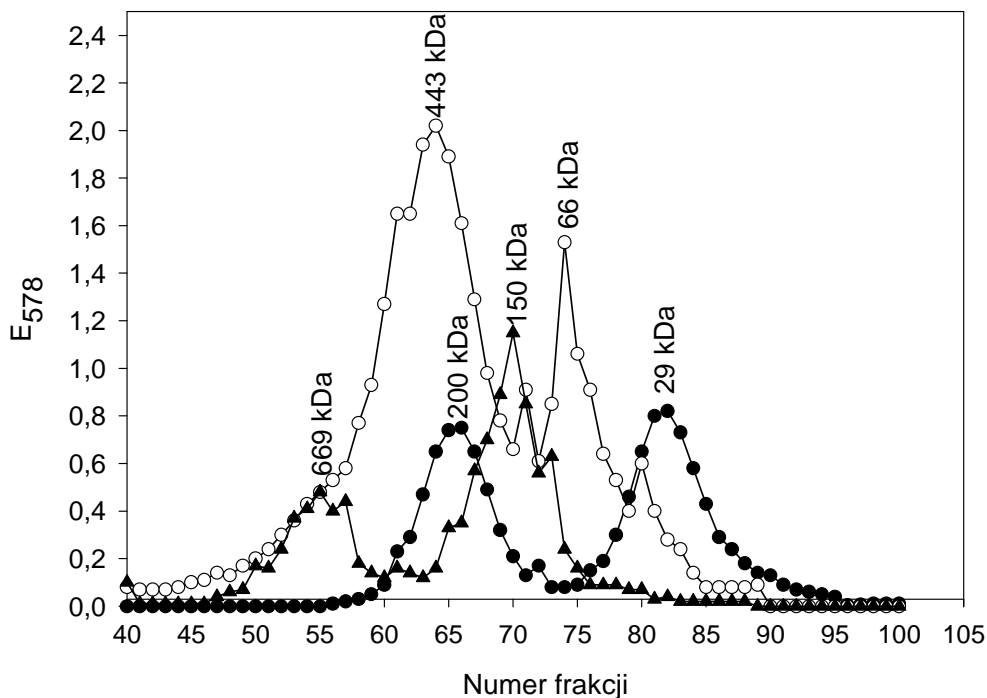
Rozdział elektroforetyczny prowadzono przez 30 minut przy napięciu prądu 100V, a następnie przez 1 godzinę przy napięciu prądu 120V. Dla uwidocznienia obecności białka, żel wytrząsano przez 30 minut w roztworze barwiącym Coomasie Brilliant Blue, a następnie odbarwiano w mieszaninie o składzie: metanol: kwas octowy: woda w proporcjach 2:1:8 v/v/v. Odbarwiony żel płukano wodą destylowaną, a następnie suszono.

Jako standardów kalibracyjnych używano białek wzorcowych firmy Pharmacia (LWM Calibration Kit).

4.7 Filtracja żelowa na kolumnie z Sepharozą CL-6B

Aktywne formy enzymu o różnym stopniu zagregowania identyfikowano przy pomocy sączenia molekularnego z wykorzystaniem Sepharozy CL-6B jako złoża. W celu wykalibrowania kolumny (kolumna K-70 firmy szwedzkiej Pharmacia, o wymiarach 1,6x60 cm) używano zastawu białek kalibracyjnych firmy Sigma-Aldrich (USA) zawierającego: anhydrazę węglanową (29 kDa), albuminę (66 kDa), dehydrogenazę alkoholową (150 kDa), β-amylazę (200 kDa), apoferrytynę (443 kDa), tyreoglobulinę (669 kDa) (Ryc.2).

Po wykalibrowaniu kolumny, nanoszono na nią 1 – 1,5 ml zagęszczonego roztworu enzymu, zawierającego około 1,5 mg białka, a następnie eluowano ją 0,1 M buforem bursztynianowym o pH 6,5, zawierającym 100 mM chlorek potasu lub, ewentualnie, dodatkowo 1 mM ATP. W wypływającym z kolumny eluacie, zbieranym we frakcjach o objętości 1,15 ml mierzono aktywność enzymu oraz stężenie białka. Szybkość elucji z kolumny wynosiła około 7 ml/h.



Ryc. 2. Kalibracja kolumny z Sepharozą CL-6B przy użyciu zestawu białek kalibracyjnych [anhydraza węglanowa (29 kDa), albumina (66 kDa), dehydrogenaza alkoholowa (150 kDa), β -amylaza (200 kDa), apoferrytyna (443 kDa), tyreoglobulina (669 kDa)].

4.8 Miareczkowanie grup sulfhydrylowych enzymu

W celu usunięcia śladów tioetanolu, rechromatografowany preparat enzymatyczny poddawano wyczerpującej, 24-godzinnej dializie wobec 0,05 M buforu fosforanowego (pH 7,8, $I = 0,1$) z dodatkiem 0,45 M chlorku potasu i następnie zagęszczano. Mieszanina reakcyjna o objętości 1 ml zawierała enzym w ilości 0,7 mg, 0,05 M bufor fosforanowy o pH 7,8 zawierający 0,45 M KCl oraz kwas 5,5'-dwutio-bis(2-nitrobenzoesowy) (DTNB) w stężeniu 200 μ M. Miareczkowanie przeprowadzano w temperaturze 36⁰C.

Reakcje grup sulfhydrylowych enzymu z DTNB mierzono (w czasie 0 – 60 minut) spektrofotometrycznie (Beckman DU-68), wykreślając przy długości fali 420 nm przyrastającą absorbancję, wynikającą z uwalniania się jonu tionitrobenzoesowego. Liczbę reaktywnych grup sulfhydrylowych wyliczano na

podstawie zmierzonego przyrostu absorbancji oraz molowego współczynnika ekstynkcji (13,300/M/cm).

4.9 Izolacja całkowitego komórkowego RNA

Całkowity komórkowy RNA izolowano z 1 g tkanki wedle metody opisanej przez Chomczyńskiego i Sacchi (68). Oczyszczony RNA rozpuszczano w wodzie jałowej z dodatkiem DMPC, po czym przechowywano zamrożony w temperaturze -20°C . Stężenie RNA w próbkach mierzono spektrofotometrycznie (Beckman DU-68), przy długości fali 260 nm, korzystając ze wzoru:

$$[\text{RNA}] \mu\text{g/ml} = \text{OD-260} \times 40 \times \text{rozcieńczenie}$$

gdzie OD-260 oznacza absorbancję przy długości fali 260nm, a liczba 40-współczynnik ekstynkcji dla RNA.

4.10 Elektroforeza agarozowa RNA

W celu przygotowania żelu, 0,4 g agarozy rozpuszczano w 40 ml buforu elektrodowego z dodatkiem 0,41 M formaldehydu, po czym podgrzewano. Po ostudzeniu do temperatury około 40°C , do agarozy dodawano 5 μl bromku etydyny, wylewano do foremki i pozostawiano do ostygnięcia.

Do próbek zawierających 10 μg całkowitego komórkowego RNA dodawano 10 μl buforu SB, po czym denaturowano przez 15 minut w temperaturze 68°C i następnie schładzano 5 minut w lodzie. Po dodaniu 5 μl buforu obciążającego próbki nanoszono do studzienek w żelu.

Rozdział elektroforetyczny prowadzono przez 3 godziny w aparacie wypełnionym buforem elektrodowym, przy napięciu prądu 32V.

4.11 Przygotowanie RNA wolnego od DNA

1 μg wyizolowanego wcześniej RNA umieszczano w próbówce zawierającej 1 μl buforu 10 x stężonego oraz 2 μl DNazy. Całość uzupełniano wodą jałową do objętości 10 μl , po czym inkubowano 30 minut w 37⁰C. Po inkubacji do każdej próbówki dodawano 1 μl 25 mM EDTA i inkubowano raz jeszcze przez 10 minut w temperaturze 65⁰C. Tak przygotowana próbka RNA służyła jako matryca do syntezy cDNA.

4.12 Odwrotna transkrypcja

W celu otrzymania cDNA genów kodujących właściwe izozymy deaminazy AMP (*AMPD1*, *AMPD2* i *AMPD3*) oraz genu *CN-1* kodującego cytozoolową 5'-nukleotydazę I, przeprowadzano odwrotną transkrypcję (RT – Reverse Transcription), wykorzystując do tego celu wyizolowany z komórek całkowity RNA.

Reakcję RT, w której RNA posłużył jako matryca, przeprowadzano w próbkach typu eppendorf z użyciem zestawu odczynników komercyjnych (Fermantas). Do próbek zawierających 2 μg całkowitego komórkowego RNA dodawano 1 μl oligo dT i po uzupełnieniu wodą do objętości 12 μl inkubowano je przez 5 minut w temperaturze 70⁰C, po czym chłodzono przez 5 minut w 4⁰C. Po ochłodzeniu do próbek dodawano 7 μl mieszaniny o składzie: 4 μl bufor 5 x stężony, 1 μl inhibitor RNaz, 2 μl 10 mM dNTP. Próbki inkubowano 5 minut w temperaturze 37⁰C, po czym do każdej z nich dodawano po 1 μl odwrotnej transkryptazy. Próby inkubowano kolejno: 60 minut w 42⁰C, 10 minut w 70⁰C i 10 minut w 4⁰C.

4.13 Optymalizacja warunków reakcji PCR pozwalająca na powielenie cDNA *AMPD1*, *AMPD2*, *AMPD3* oraz *CN-1*

W reakcji PCR, prowadzonej z użyciem otrzymanego w procesie odwrotnej transkrypcji cDNA, używano mieszaninę reakcyjną o składzie: 2,5 μ l buforu 10 x stężonego, 1,5 μ l $MgCl_2$, 1 μ l dNTPs, po 1 μ l primera sensownego i antysensownego, 1 U Taq 4 DNA oraz 2 μ l matrycy. Całość uzupełniano wodą do 25 μ l.

Profil termiczny reakcji PCR: 94°C przez 5 minut, denaturacja w 94°C przez 1 minutę, dodanie starterów (61°C dla *AMPD1*, 66°C dla *AMPD2*, 63°C dla *AMPD3*) przez 45 sekund oraz polimeryzacja w 72°C przez 1 minutę. Liczba cykli dla *AMPD1* i *AMPD3* wynosiła 33, a dla *AMPD2* 35. Parametry reakcji PCR dla genu *CN-1*: 94°C przez 5 minut, denaturacja w 94°C przez 1 minutę, dodanie starterów w 62°C przez 1 minutę oraz polimeryzacja w 72°C przez 1 minutę. Liczba cykli wynosiła 33.

Ustalenie optymalnych warunków reakcji PCR obejmowało określenie ilości dodawanej matrycy oraz profilu termicznego reakcji. Zmieniano temperaturę reakcji, liczbę cykli i czas trwania poszczególnych etapów reakcji. Dla ilościowej kontroli otrzymanych wyników przeprowadzano równocześnie reakcję PCR ze starterami zaprojektowanymi w oparciu o sekwencję ludzkiej β -aktyny.

4.14 Elektroforeza agarozowa DNA

0,525 g 1,5% agarozы rozpuszczano w 700 μ l buforu TAE 50 x stężonego i uzupełniano wodą do 35 ml. Tak przygotowaną agarozę podgrzewano, a po ostudzeniu do temperatury około 40°C, dodawano 2 μ l bromku etydyny. Żel wylewano do foremki i pozostawiano do ostygnięcia. Otrzymane po reakcji PCR próbki nanoszono do studzienek żelu. Rozdział prowadzono w buforze

elektrodowym 1 x TAE przez 1 godzinę, przy napięciu prądu 70V, w aparacie do elektroforezy (FOTODYNE, USA).

4.15 Analiza densytometryczna

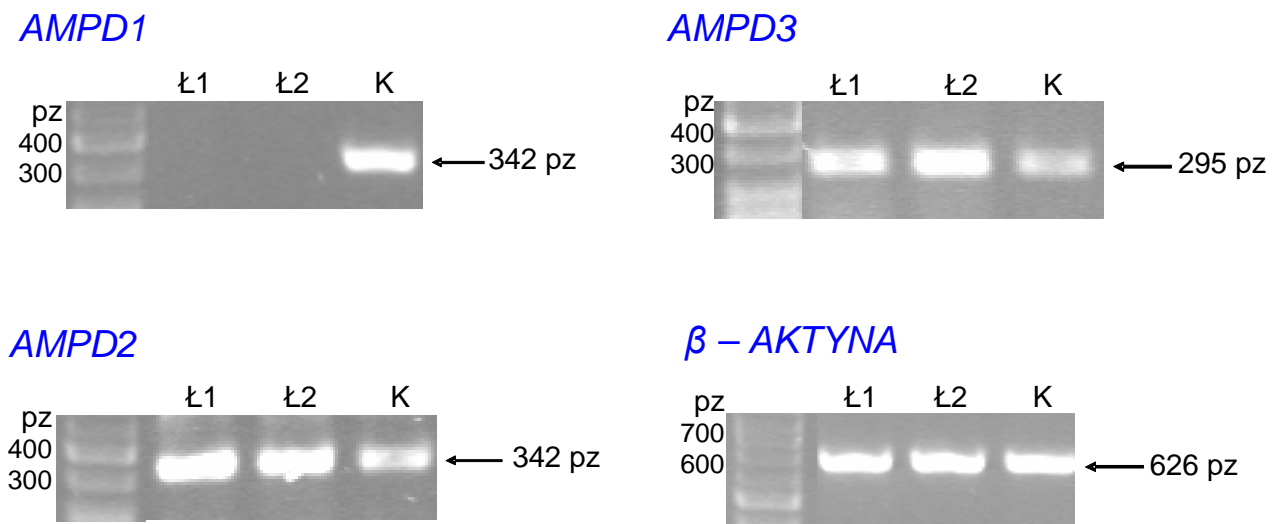
Analizę densytometryczną żeli przeprowadzono z wykorzystaniem systemu Gel Doc 2000, analizującego intensywność prążków badanych w oparciu o program Quantity One (Bio-Rad, USA). Wyniki analizy densytometrycznej żeli wykorzystano dla określenia względnej ilości mRNA genów kodujących izoformy deaminazy AMP.

5. WYNIKI

5.1 Ekspresja genów deaminazy AMP oraz cytozolowej 5'-nukleotydazy I w łożysku ludzkim

Na rycinie 3 przedstawiono ekspresję genów deaminazy AMP w łożysku ludzkim. Wynika z niej, że spośród genów rodziny *AMPD* w tkance tej zachodzi jedynie ekspresja genów *AMPD2* i *AMPD3*, kodujących odpowiednio izozymy wątrobowy (L) i erytrocytarny (E). Ekspresja genu *AMPD1*, kodującego izozym mięśniowy (M) deaminazy AMP, w łożysku ludzkim nie zachodzi. Analiza densytometryczna (Ryc.4) uzyskanych wyników wykazała, że ekspresja genu *AMPD2* jest dominującą.

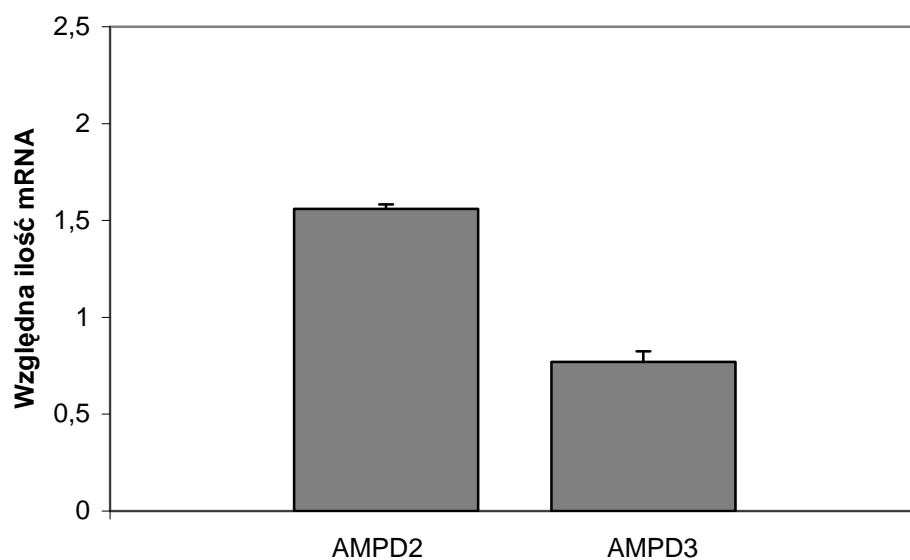
W łożysku ludzkim nie zachodzi również ekspresja genu *CN-1*, kodującego cytozolowy, AMP-specyficzny izozym 5'-nukleotydazy (Ryc. 5).



Ryc. 3. Ekspresja genów rodziny *AMPD* w łożysku ludzkim.

Ł1, Ł2 – łożysko ludzkie, K- mięsień szkieletowy człowieka (kontrola).

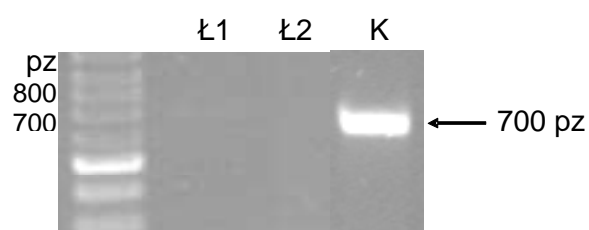
Ekspresję genów *AMPD1*, *AMPD2* i *AMPD3* odniesiono do ekspresji genu wzorcowego (gen β -aktyny).



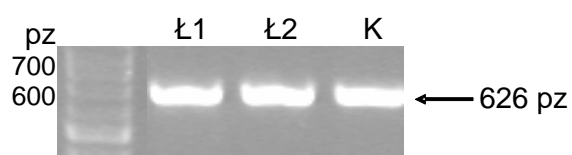
Ryc. 4. Szacunkowe poziomy mRNA izozymów deaminazy AMP w łożysku ludzkim.

W ocenie statystycznej wyników wykorzystano test t-Studenta ($p < 0,01$).

CN-1



β - AKTYNA



Ryc. 5. Ekspresja genu *CN-1* w łożysku ludzkim.

Ł1, Ł2 – łożysko ludzkie, K- mięsień szkieletowy człowieka (kontrola).
Ekspresję genu *CN-1* odniesiono do ekspresji genu wzorcowego (gen β -aktyny).

5.2 Oczyszczanie deaminazy AMP z łożyska ludzkiego

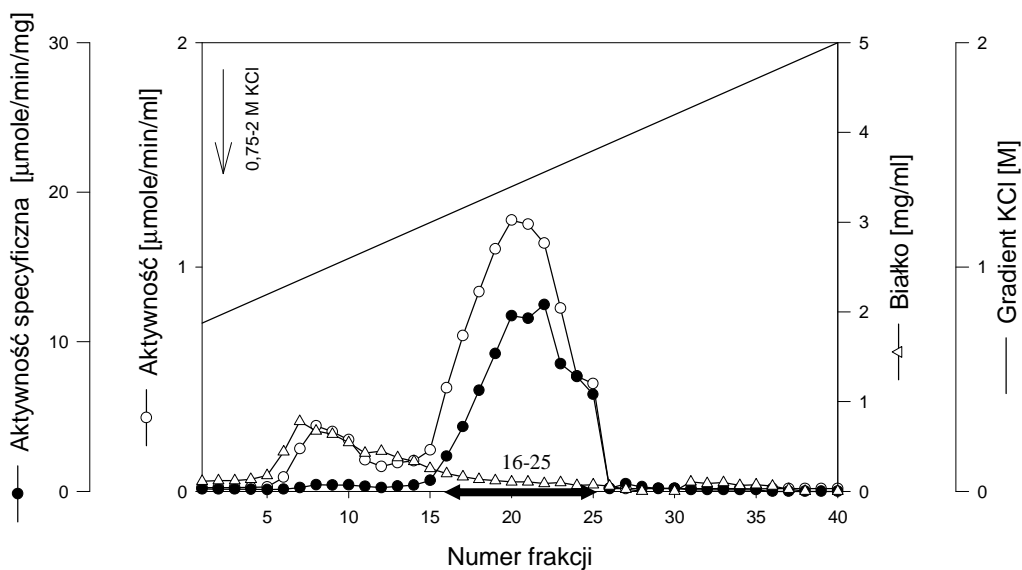
Ryciny 6 i 7 przedstawiają rozdział chromatograficzny deaminazy AMP z łożyska ludzkiego na kolumnie z fosfocelulozą P-11.

Jak to pokazano na Rycinie 6, płukanie kolumny 0,75 – 2 M gradientem stężeń chlorku potasu uwolniło z podłoża dwa, oddzielone od siebie szczyty aktywności. Wyływający z kolumny przy około 1,3 M stężeniu KCl szczyt zasadniczy, poprzedzony był szczytem mniejszym, wyływającym przy około 0,8 M stężeniu tej soli i wykazującym niską aktywność specyficzną.

Rechromatografia na fosfocelulozie najbardziej aktywnych frakcji szczytu zasadniczego z użyciem 2 M stopu chlorku potasu (Ryc. 7), uwolniła z podłoża pojedynczy szczyt aktywności, dobrze skorelowany z wyływającym białkiem.

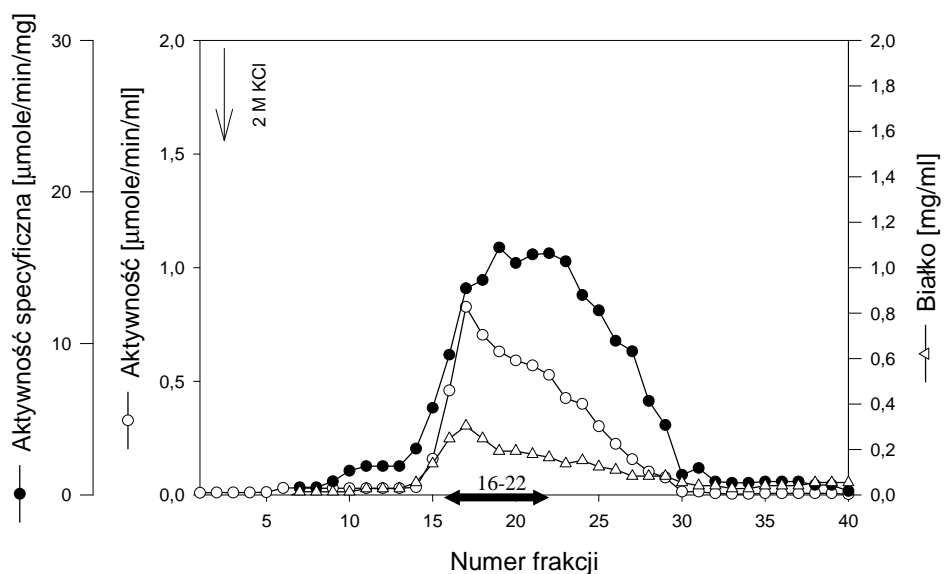
Jak to wynika z przedstawionych w Tabeli I danych, jednokrotna chromatografia na fosfocelulozie (Ryc. 6) oczyściła enzym łożyskowy ponad 400-krotnie.

Otrzymany w wyniku podwójnej chromatografii (Ryc. 8) enzym był oczyszczony ponad 500-krotnie i wykazywał aktywność specyficzną jedenaście mikromoli rozłożonego substratu na minutę, na miligram białka (Tabela I).



Ryc. 6. Deaminaza AMP łożyska ludzkiego – chromatografia enzymu na fosfofelulozie P-11.

Enzym eluowano 0,75 - 2 M gradientem chlorku potasu. Aktywność enzymu mierzono w 10 mM stężeniu substratu.



Ryc. 7. Deaminaza AMP łożyska ludzkiego – rechromatografia enzymu na fosfofelulozie P-11.

Enzym eluowano 2 M stepem chlorku potasu. Aktywność enzymu mierzono w 10 mM stężeniu substratu.

Tabela I Oczyszczanie deaminazy AMP z łożyska ludzkiego

ETAP OCZYSZCZANIA	BIAŁKO [mg]	AKTYWNOŚĆ CAŁKOWITA [μ mole/min/ml]	AKTYWNOŚĆ SPECYFICZNA [μ mole/min/mg białka]	STOPIEŃ OCZYSZCZENIA	WYDAJNOŚĆ (%)
Homogenat tkankowy	2760,1	57,0	0,02	1	100
Chromatografia na fosfocelulozie	2,5	24,0	9,3	465	42
Rechromatografia na fosfocelulozie	1,0	10,8	11,2	560	19

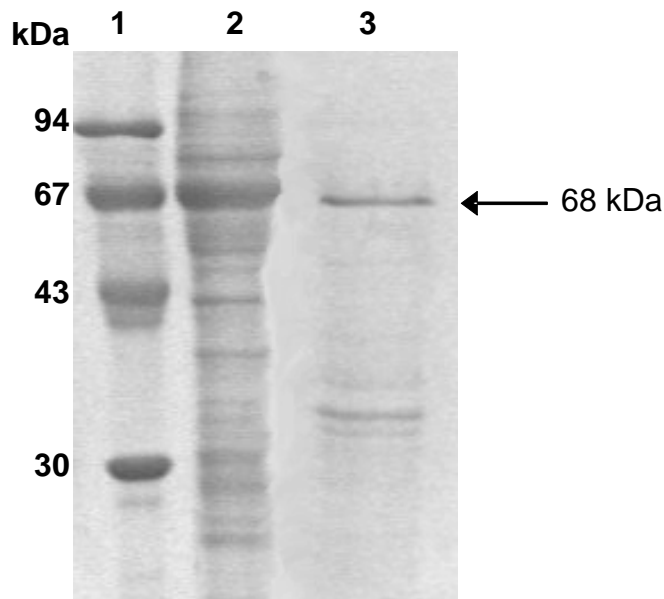
Aktywność enzymu mierzono w 0,1 M buforze bursztynianowym, pH 6,5, w 10 mM stężeniu substratu.

5.3 Właściwości fizykochemiczne enzymu „świeżego”

5.3.1 Rozdział elektroforetyczny

Rycina 8 przedstawia elektroforezę świeżo oczyszczonej (enzym „świeży”) deaminazy AMP z łożyska ludzkiego.

Jak to wynika z przedstawionej Ryciny, z uwidocznionych w elektroforezie białek, najwolniej migrującym było białko o masie cząsteczkowej około 68 kDa. Towarzyszyły mu inne, o mniejszych masach cząsteczkowych, będące przypuszczalnie produktami degradacji i/lub dezagregacji białka pierwszego (Ryc. 16).

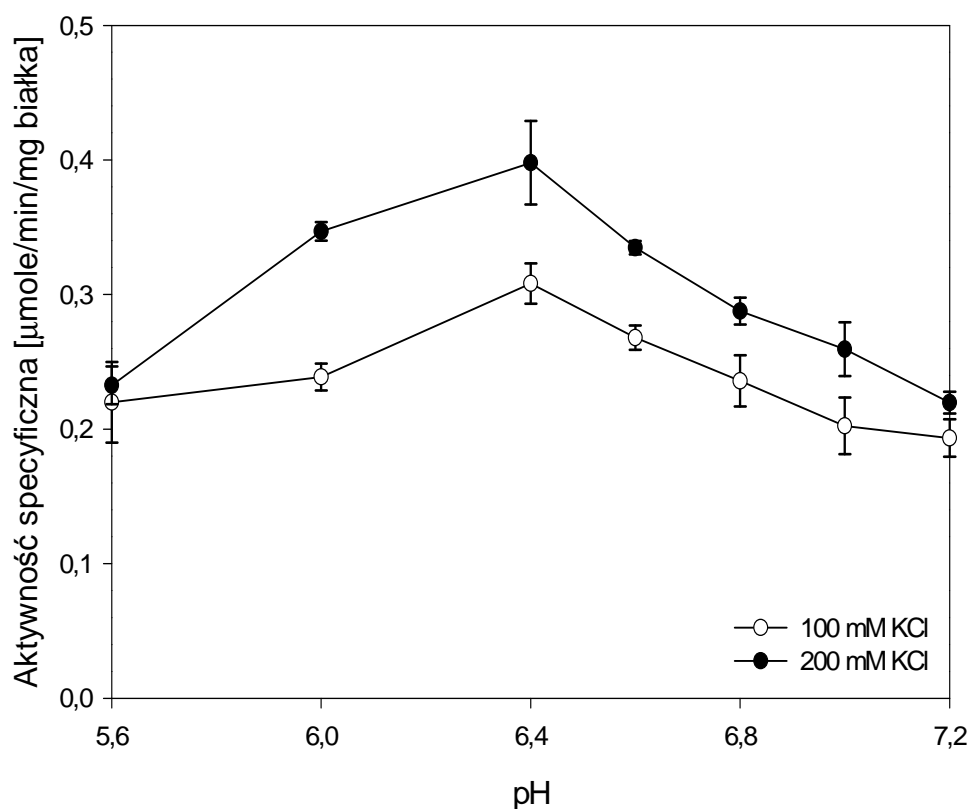


Ryc. 8. Deaminaza AMP łożyska ludzkiego - elektroforeza na żelu poliakrylamidowym w obecności SDS-u.

Oznaczenia: 1- standardy [fosforylaza b (94 kDa), albumina (67 kDa), ovalbumina (43 kDa), anhidraza węglanowa (30 kDa)], 2- homogenat z łożyska ludzkiego, 3- enzym świeżo oczyszczony.

5.3.2 Właściwości kinetyczno–regulacyjne

Rycina 9 przedstawia wpływ pH na aktywność deaminazy AMP łożyska ludzkiego, mierzoną w obecności 100 i 200 mM chlorku potasu. Jak to wynika z przedstawionej Ryciny, w obydwu stężeniach tej soli optimum aktywności badanego enzymu przypadło na pH około 6,4. W całym zakresie badanych zmian pH zaobserwowano wyższą aktywność enzymu w 200 mM stężeniu chlorku potasu.



Ryc. 9. Deaminaza AMP łożyska ludzkiego - wpływ pH oraz stężenia jonów potasowych na aktywność enzymu „świeżego”.

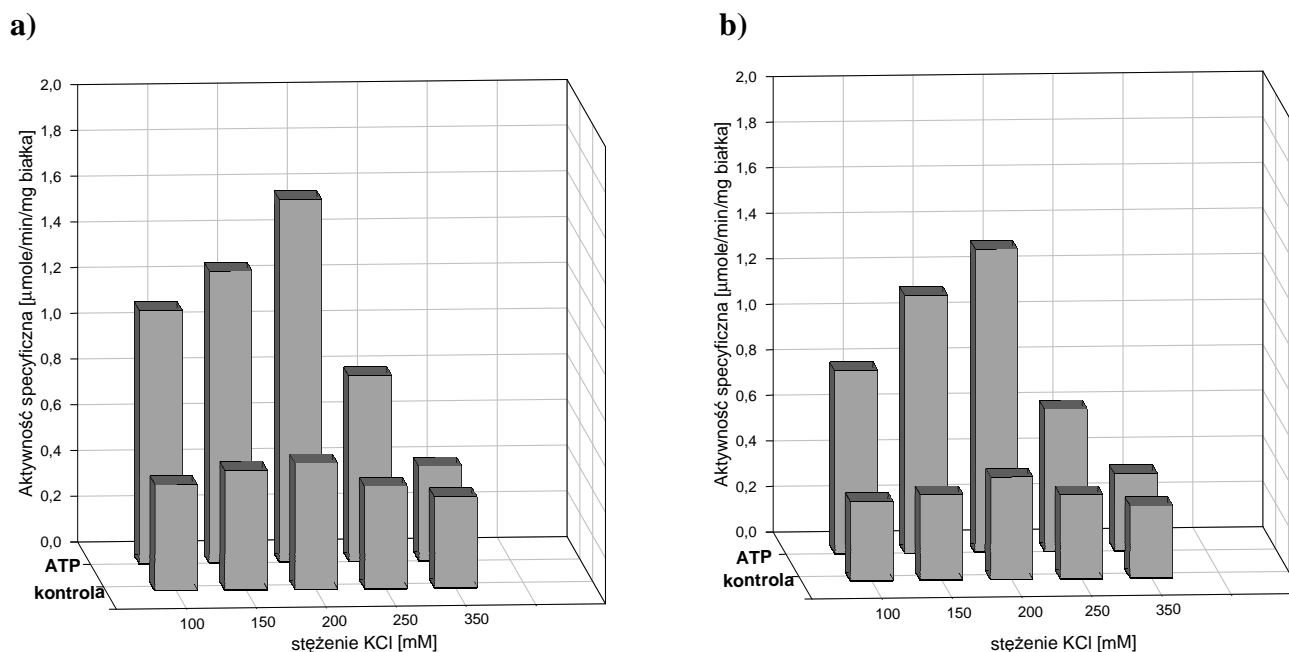
Aktywność enzymu mierzono w 0,1 M buforze kakodylanowym, w 2,5 mM stężeniu substratu, w obecności 100 i 200 mM KCl.

Przedstawione na Rycinie aktywności są średnimi z trzech niezależnych pomiarów.

Rycina 10 ilustruje wpływ stężenia jonów potasowych na aktywność deaminazy AMP z łożyska ludzkiego, mierzoną w pH lekko kwaśnym (6,4) i obojętnym, w nieobecności lub obecności 1 mM ATP.

Jak to wynika z przedstawionych Rycin, niezależnie od pH środowiska inkubacyjnego oraz obecności ATP, najwyższą aktywność enzymu obserwowano w 200 mM stężeniu chlorku potasu. W stężeniach wyższych (250, 350 mM) tej soli aktywność deaminazy AMP wyraźnie malała. W środowisku lekko kwaśnym (Ryc. 10a) aktywność łożyskowej deaminazy AMP była wyższa aniżeli w środowisku obojętnym (Ryc. 10b).

Obecny w środowisku inkubacyjnym 1 mM ATP, który w 100, 150 i 200 mM stężeniach KCl wyraźnie stymulował aktywność enzymu, w 350 mM stężeniu tej soli swój aktywujący wpływ niemal całkowicie zatracił.



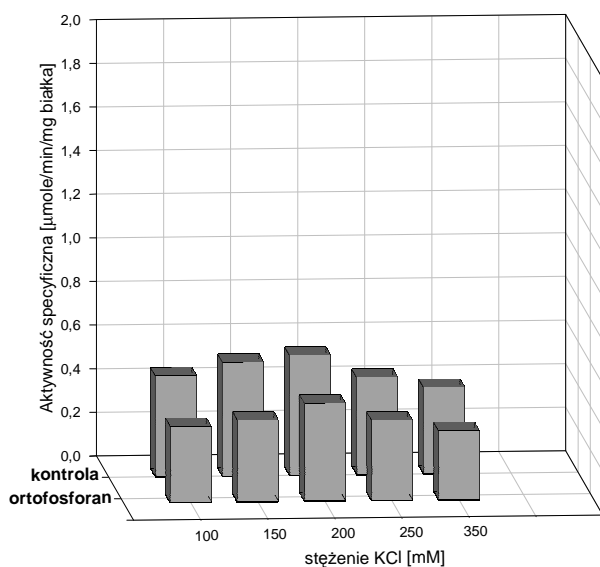
Ryc. 10. Deaminaza AMP łożyska ludzkiego – wpływ pH, stężenia jonów potasowych oraz ATP na aktywność enzymu „świeżego”.

Aktywność enzymu mierzono w 0,1 M buforze kakodylanowym, w 2,5 mM stężeniu substratu, w pH 6,4 (a) i pH 7,0 (b), w nieobecności (kontrola) lub w obecności 1 mM ATP. Przedstawione wartości aktywności stanowią średnie z trzech niezależnych pomiarów. Wartości S.D. mieściły się w zakresie $\pm 10\%$ wartości wyliczonych średnich.

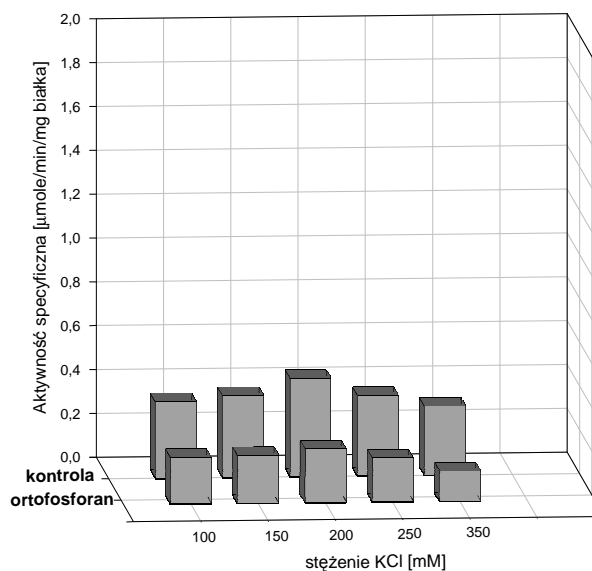
Rycina 11 ilustruje wpływ stężenia jonów potasowych na aktywność deaminazy AMP łożyska ludzkiego, mierzoną w pH lekko kwaśnym (6,4) i obojętnym, w nieobecności lub obecności 2,5 mM ortofosforanu.

Jak to wynika z przedstawionych Rycin, niezależnie od pH środowiska inkubacyjnego oraz obecności ortofosforanu, najwyższą aktywność enzymu łożyskowego obserwowano w 200 mM stężeniu chlorku potasu. Obecny w środowisku inkubacyjnym ortofosforan hamował aktywność enzymu w każdym z badanych stężeń chlorku potasu. W pH lekko kwaśnym (Ryc. 11a) hamujący wpływ ortofosforanu był mniej widoczny aniżeli w pH obojętnym (Ryc. 11b).

a)



b)



Ryc. 11. Deaminaza AMP łożyska ludzkiego – wpływ pH, stężenia jonów potasowych oraz ortofosforanu na aktywność enzymu „świeżego”.

Aktywność enzymu mierzono w 0,1 M buforze kakodylanowym, w 2,5 mM stężeniu substratu, w pH 6,4 (a) i pH 7,0 (b), w nieobecności (kontrola) lub w obecności 2,5 mM ortofosforanu.

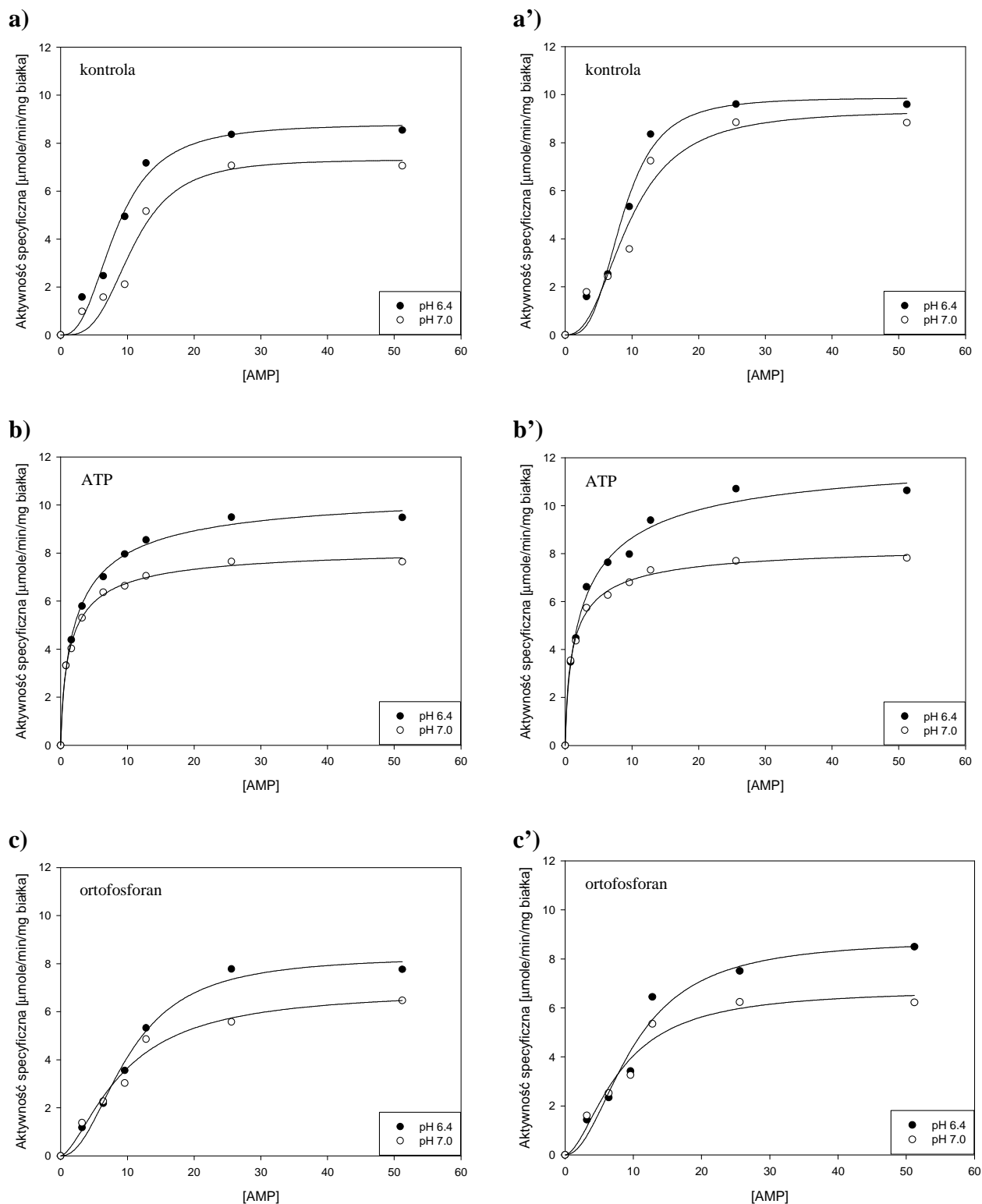
Przedstawione wartości aktywności stanowią średnie z trzech niezależnych pomiarów. Wartości S.D. mieściły się w zakresie $\pm 10\%$ wartości wyliczonych średnich.

Rycina 12 przedstawia krzywe kinetyczne wysycenia enzymu substratem, dla reakcji katalizowanej przez deaminazę AMP łożyska ludzkiego, mierzonej w środowisku o pH lekko kwaśnym (6,4) i obojętnym, zawierającym 100 mM lub 200 mM chlorek potasu oraz efektory (1 mM ATP lub 2,5 mM ortofosforan).

Jak to wynika z przedstawionych wykresów, w nieobecności ATP (Ryc. 12a,a'), w obydwu badanych pH, enzym wykazywał kinetykę sigmoidalną. Wyznaczona dla enzymu stała półwysycenia ($S_{0,5}$) była nieco niższa w pH lekko kwaśnym aniżeli w pH obojętnym (Tabela II).

Dodanie do środowiska inkubacyjnego 1 mM ATP (Ryc. 12b,b') badaną deaminazę AMP wyraźnie uaktywniło. Następstwem aktywacji była hiperbolizacja krzywych kinetycznych oraz wynikający z tego spadek wartości $S_{0,5}$. Powyższym zmianom towarzyszył także wzrost szybkości maksymalnej reakcji (Tabela II).

Dodanie do środowiska inkubacyjnego 2,5 mM ortofosforanu (Ryc. 12c,c') nie zmieniając sigmoidalnego profilu krzywych kinetycznych, spowodowało nieznaczne podwyższenie (w pH 6,4) lub obniżenie (w pH 7,0) wartości stałej półwysycenia ($S_{0,5}$) oraz obniżenie szybkości maksymalnej reakcji (Tabela II).



Ryc. 12. Deaminaza AMP łożyska ludzkiego – krzywe kinetyczne wysycenia substratem enzymu „świeżego”.

Aktywność enzymu mierzono w 0,1 M buforze kakodylanowy o pH 6,4 i 7,0, w obecności 100 mM (a,b,c) lub 200 mM (a',b',c') chlorku potasu, z dodatkiem 1 mM ATP (b,b') lub 2,5 mM ortofosforanu (c,c'). Do prób dodawano 5 μg enzymu.

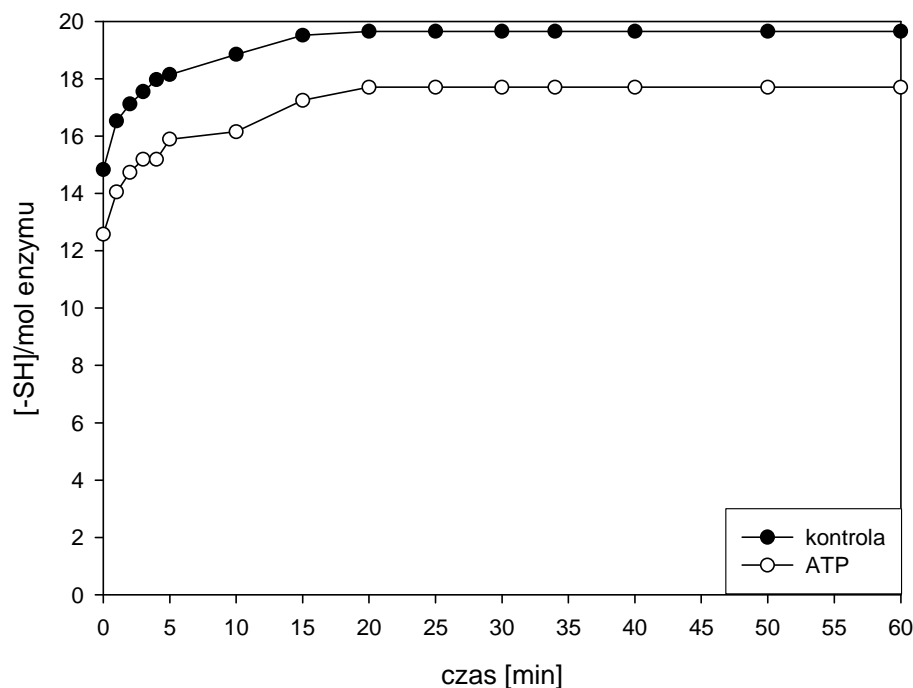
Tabela II Wpływ pH, stężenia jonów potasowych, ATP i ortofosforanu na parametry kinetyczne reakcji katalizowanej przez „świeży” preparat deaminazy AMP łożyska ludzkiego

Dodany efektor	pH 6,4			pH 7,0		
	S _{0,5}	n _H	V _{max}	S _{0,5}	n _H	V _{max}
kontrola (100 mM KCl)	8,4	2,6	8,9	10,8	3,1	7,4
kontrola (200 mM KCl)	8,6	3,3	9,9	9,6	2,4	9,4
1 mM ATP (100 mM KCl)	2,6	0,8	10,8	1,5	0,8	8,3
1 mM ATP (200 mM KCl)	3,4	0,7	12,6	1,2	0,8	8,2
2,5 mM ortofosforan (100 mM KCl)	10,1	2,2	8,3	8,7	1,8	6,6
2,5 mM ortofosforan (200 mM KCl)	9,2	2,6	8,4	8,0	1,7	6,8

Wartości przedstawione w Tabeli stanowią średnią z trzech niezależnych doświadczeń. Wartości S.D. mieściły się w zakresie $\pm 10\%$ wartości wyliczonych średnich.

5.3.3 Pomiar reaktywnych grup sulfhydrylowych

Rycina 13 ilustruje przebieg miareczkowania DTNB świeżo otrzymanej deaminazy AMP z łożyska ludzkiego. Jak to wynika z przedstawionej Ryciny, miareczkowanie to ujawniło obecność około dwudziestu (w przeliczeniu na mol enzymu) reaktywnych grup sulfhydrylowych. Pierwsze 15 grup reagowało z DTNB natychmiast; pozostałe ujawniły się natomiast w ciągu kolejnych 20 minut miareczkowania. Dodanie do środowiska inkubacyjnego 1 mM ATP zmniejszyło liczbę grup sulfhydrylowych reagujących z DTNB natychmiast z 15 do 13. Po 20 minutach miareczkowania liczba tych grup wzrosła do 17 i nie uległa już zmianie w późniejszym okresie.



Ryc. 13. Deaminaza AMP łożyska ludzkiego – miareczkowanie DTNB reaktywnych grup sulfhydrylowych enzymu.

Mieszanka reagująca zawierała 0,7 mg enzymu rozpuszczonego w 1 ml 0,05 M buforu fosforanowego, z dodatkiem 200 μ M DTNB oraz, ewentualnie, 1 mM ATP.

5.3.4 Wyznaczenie form agregacyjnych

Rycina 14 (a-b) przedstawia filtrację na Sepharozie CL-6B deaminazy AMP z mięśnia szkieletowego człowieka.

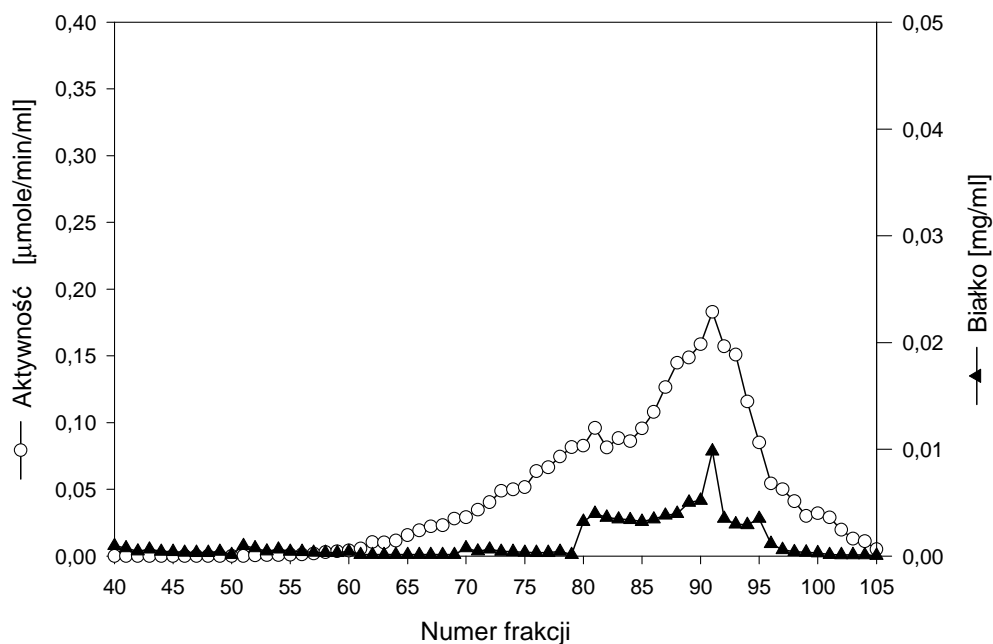
Jak to przedstawia Rycina 14 a, w obecności 100 mM chlorku potasu, filtrowany enzym wypływał z kolumny w postaci jednego asymetrycznego, dobrze skorelowanego z wypływającym białkiem, szczytu aktywności. Najwyższą aktywność enzymu odnotowano we frakcji 92.

Obecność w buforze elucyjnym 1 mM ATP (Ryc. 14b), nie zmieniła znacząco opisanego powyżej profilu elucji, zaś wypływająca aktywność (ze szczytem we frakcji 93) była dobrze skorelowana z wypływającym białkiem. Dodatkowym skutkiem obecności ATP było uformowanie się niewielkiego szczytu aktywności zawierającego niemierzalną ilość białka, o najwyższej aktywności we frakcji 58.

Rycina 15 (a-b) przedstawia przeprowadzoną w podobnych warunkach filtrację żelową deaminazy AMP z łożyska ludzkiego.

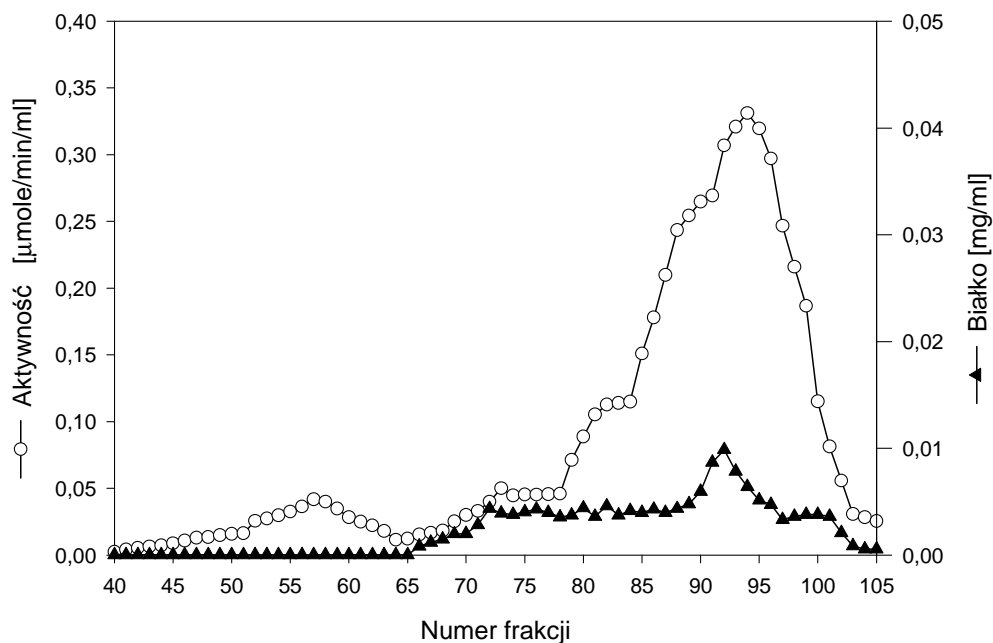
Jak to wynika z Ryciny 15 a, w obecności 100 mM chlorku potasu, filtrowany enzym wypływał z kolumny w postaci asymetrycznych szczytów aktywności, dość dobrze skorelowanych z wypływającym białkiem, z najwyższymi aktywnościami we frakcjach 92 i 82.

Obecność w buforze elucyjnym 1 mM ATP (Ryc. 15b), oprócz uaktywnienia enzymu, spowodowała pojawienie się w eluacie dodatkowych, nieźle skorelowanych z wypływającym białkiem, szczytów aktywności, o najwyższych aktywnościach we frakcjach 58, 68, 84 i 94.



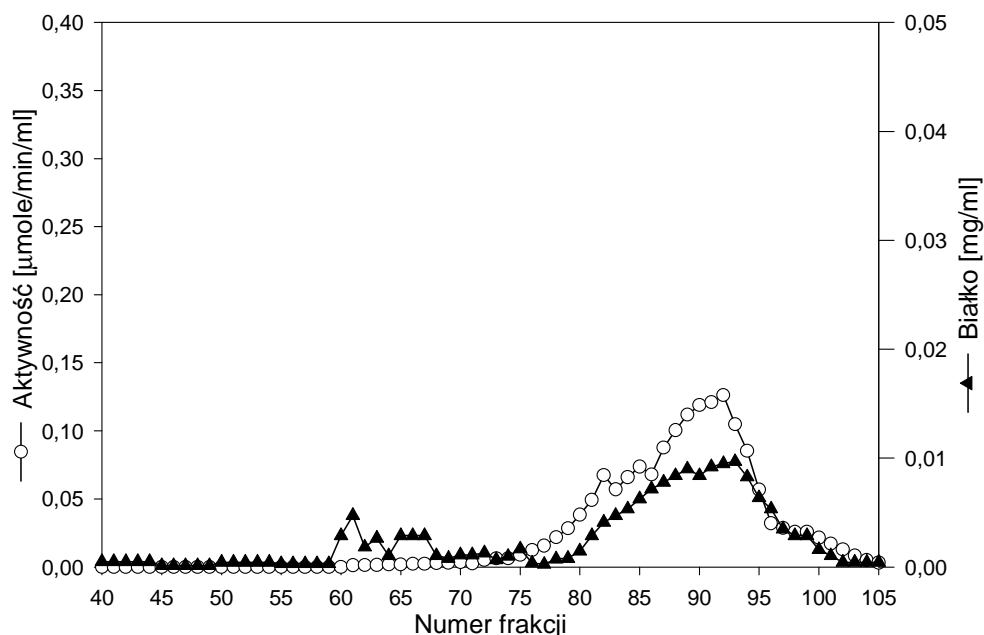
Ryc. 14 a. Deaminaza AMP mięśnia szkieletowego człowieka – elucja enzymu z kolumny wypełnionej Sepharozą CL-6B.

Elucję przeprowadzono 0,1 M buforem bursztynianowym o pH 6,4, zawierającym 100 mM stężenie chlorku potasu. Na kolumnę nakładano około 0,1 mg enzymu.



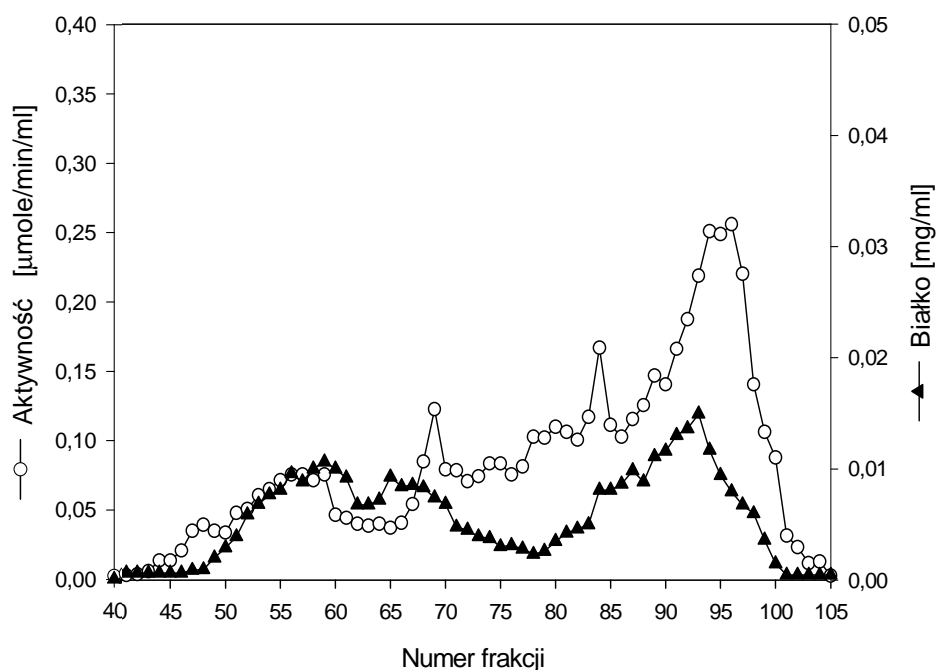
Ryc. 14 b. Deaminaza AMP mięśnia szkieletowego człowieka – elucja enzymu z kolumny wypełnionej Sepharozą CL-6B.

Elucję przeprowadzono 0,1 M buforem bursztynianowym o pH 6,4, zawierającym 100 mM stężenie chlorku potasu oraz 1 mM ATP. Na kolumnę nakładano około 0,1 mg enzymu.



Ryc. 15 a. Deaminaza AMP łożyska ludzkiego – elucja enzymu z kolumny wypełnionej Sepharozą CL-6B.

Elucję przeprowadzono 0,1 M buforem bursztynianowym o pH 6,4, zawierającym 100 mM stężenie chlorku potasu. Na kolumnę nakładano 1 mg enzymu.



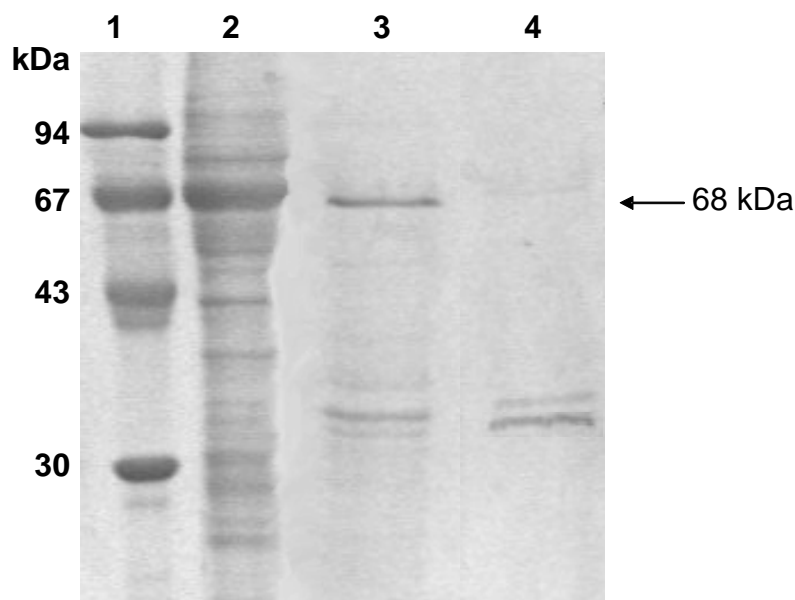
Ryc. 15 b. Deaminaza AMP łożyska ludzkiego – elucja enzymu z kolumny wypełnionej Sepharozą CL-6B.

Elucję przeprowadzono 0,1 M buforem bursztynianowym o pH 6,4 zawierającym 100 mM stężenie chlorku potasu oraz 1 mM ATP. Na kolumnę nakładano 1mg enzymu.

5.4 Właściwości fizykochemiczne enzymu „przechowywanego”

5.4.1 Rozdział elektroforetyczny

Rycina 16 przedstawia rozdziały elektroforetyczne świeżo oczyszczonego (enzym „świeży”) oraz przechowywanego pięć dni w temperaturze 4⁰C (enzym „przechowywany”) preparatu deaminazy AMP z łożyska ludzkiego. Jak to wynika z przedstawionej Ryciny, uwidocznione w elektroforezie enzymu „świeżego” (Ryc. 8) białko o masie 68 kDa, po pięciu dniach przechowywania przestało być widoczne. Kilkudniowe przechowywanie enzymu w lodówce spowodowało niemal zupełną jego dezagregację i/lub degradację. Równoległe ze stopniowym zanikiem białka o wyższej masie(68 kDa), obserwowano (wynik nieprzedstawiony w pracy) narastającą akumulację białek o niższych masach cząsteczkowych (około 33 i 38 kDa). Opisanym zmianom w elektroforezie towarzyszyła wyraźna (ok. 45 %) utrata aktywności enzymu.



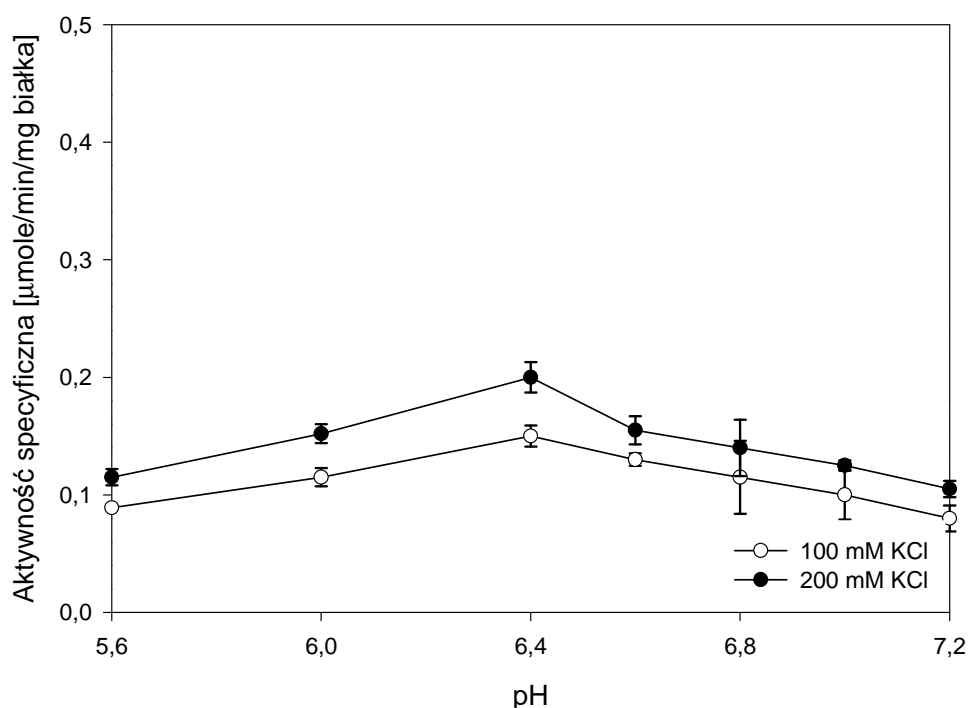
Ryc. 16. Deaminaza AMP łożyska ludzkiego - elektroforeza na żelu poliakrylamidowym w obecności SDS-u.

Oznaczenia: 1- standardy [fosforylaza b (94 kDa), albumina (67 kDa), ovalbumina (43 kDa), anhydraza węglanowa (30 kDa)], 2- homogenat z łożyska ludzkiego, 3- enzym „świeży”, 4- enzym „przechowywany”.

5.4.2 Właściwości kinetyczno–regulacyjne

Rycina 17 przedstawia wpływ pH na aktywność deaminazy AMP łożyska ludzkiego, przechowywanej pięć dni w temperaturze 4⁰C, mierzoną w obecności 100 i 200 mM chlorku potasu.

Jak to wynika z przedstawionej Ryciny, pięciodniowe przechowywanie enzymu w lodówce, poza utratą części aktywności nie zmieniło znacząco opisanego uprzednio dla enzymu „świeżego” (Ryc. 9) zależnej od profilu pH aktywności enzymu.



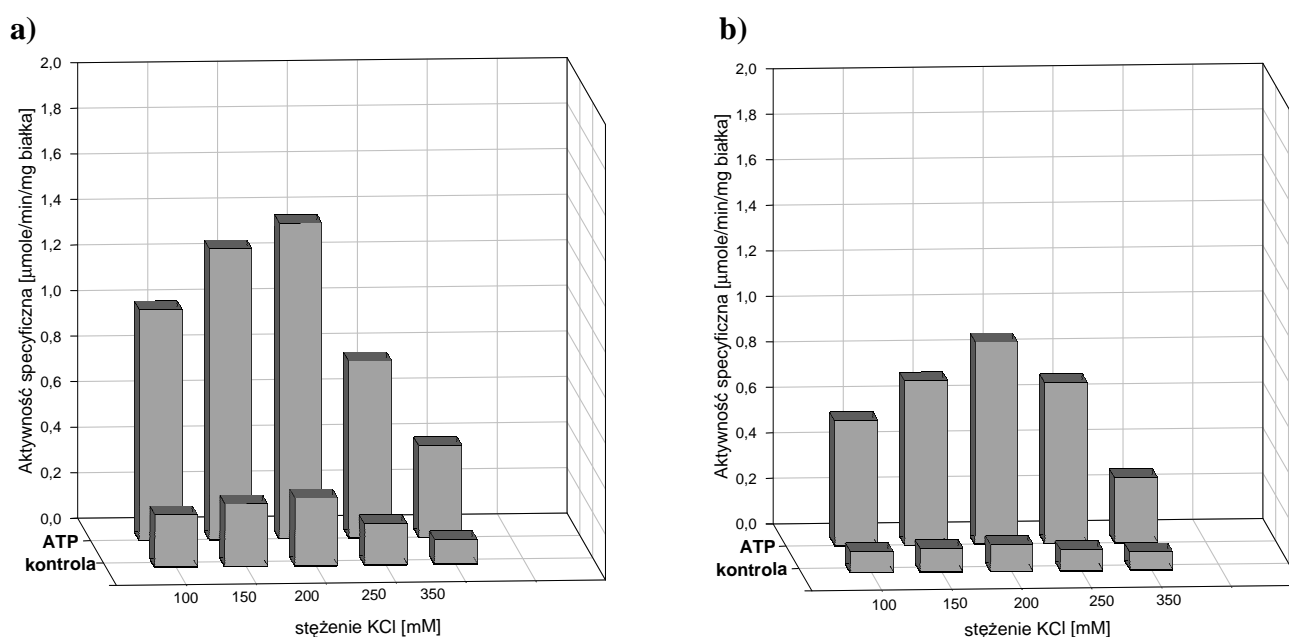
Ryc. 17. Deaminaza AMP łożyska ludzkiego - wpływ pH oraz stężenia jonów potasowych na aktywność enzymu „przechowywanego”.

Aktywność enzymu mierzono w 0,1 M buforze kakodylanowym, 2,5 mM stężeniu substratu, w obecności 100 mM i 200 mM chlorku potasu.

Przedstawione wartości aktywności stanowią średnie z trzech niezależnych pomiarów.

Rycina 18 ilustruje wpływ stężenia jonów potasowych na aktywność deaminazy AMP łożyska ludzkiego, przechowywanej pięć dni w temperaturze 4⁰C, mierzoną w pH lekko kwaśnym (6,4) i obojętnym, w nieobecności lub obecności 1 mM ATP.

Jak to wynika z przedstawionej Ryciny, poza obniżoną aktywnością, profil regulacyjny enzymu „przechowywanego” nie różnił się znacząco od profilu regulacyjnego opisanego uprzednio (Ryc. 10) dla enzymu „świeżego”. Podobnie jak w przypadku enzymu „świeżego”, najwyższą aktywność enzymu „przechowywanego” zaobserwowano w pH lekko kwaśnym, w obecności 200 mM stężenia chlorku potasu. Podobnie jak to obserwowano w przypadku enzymu „świeżego” (Ryc. 10), 1 mM ATP wyraźnie stymulował aktywność enzymu „przechowywanego”. W odróżnieniu od enzymu „świeżego”, wyraźną aktywację enzymu „przechowywanego” zaobserwowano także w obecności wyższych stężeń chlorku potasu (250, 300 mM).



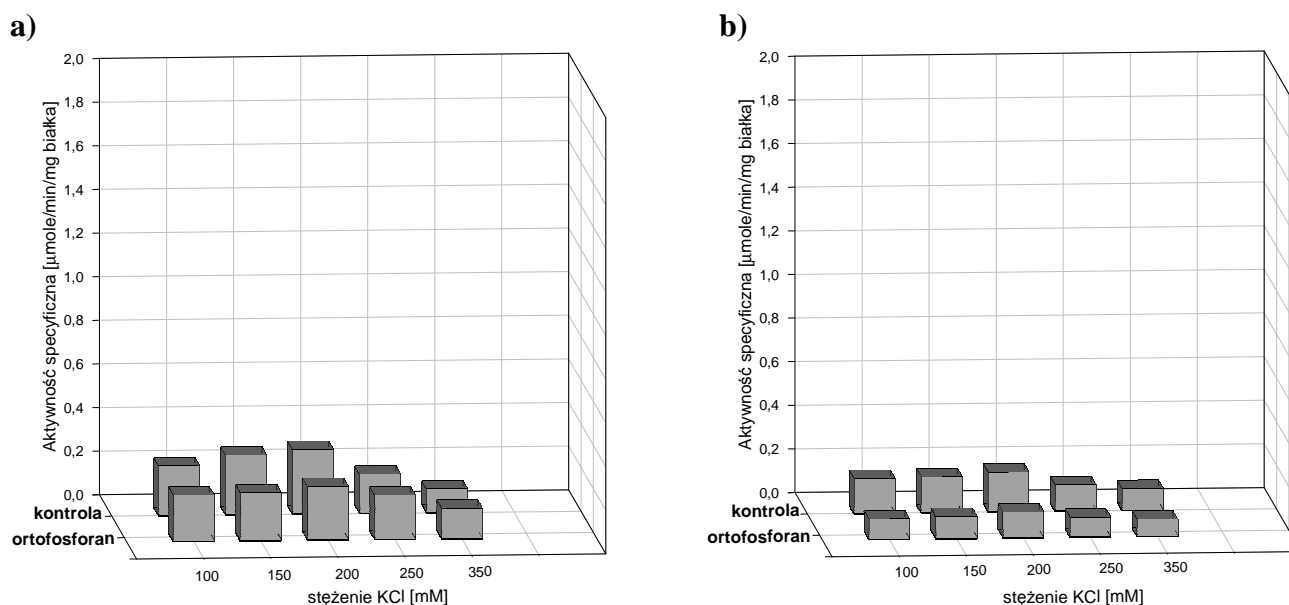
Ryc. 18. Deaminaza AMP łożyska ludzkiego – wpływ pH, stężenia jonów potasowych oraz ATP na aktywność enzymu „przechowywanego”.

Aktywność enzymu mierzono w 0,1 M buforze kakodylanowym, w 2,5 mM stężeniu substratu, w pH 6,4 (a) i pH 7,0 (b). Aktywność enzymu mierzono w nieobecności (kontrola) lub w obecności 1 mM ATP.

Przedstawione wartości aktywności stanowią średnie z trzech niezależnych pomiarów. Wartości S.D. mieściły się w zakresie $\pm 10\%$ wartości wyliczonych średnich.

Rycina 19 ilustruje wpływ stężenia jonów potasowych na aktywność deaminazy AMP z łożyska ludzkiego przechowywanej pięć dni w temperaturze 4⁰C, mierzoną w pH lekko kwaśnym (6,4) i obojętnym, w nieobecności lub obecności 2,5 mM ortofosforanu.

Jak to wynika z przedstawionej Ryciny, profil regulacyjny enzymu „przechowywanego” przedstawiał się podobnie do tego prezentowanego przez enzym „świeży” (Ryc. 11). Tak jak w przypadku enzymu „świeżego”, słaby hamujący wpływ ortofosforanu był zauważalny niemal we wszystkich stężeniach chlorku potasu. Jedynie w pH lekko kwaśnym, w wyższych stężeniach tej soli (250 i 300 mM) dało się zaobserwować lekkie stymulujące oddziaływanie tego związku (Ryc. 19a).



Ryc. 19. Deaminaza AMP łożyska ludzkiego – wpływ pH, stężenia jonów potasowych oraz ortofosforanu na aktywność enzymu „przechowywanego”.

Aktywność enzymu mierzono w 0,1 M buforze kakodylanowym, w 2,5 mM stężeniu substratu, w pH 6,4 (a) i pH 7,0 (b). Aktywność enzymu mierzono w nieobecności (kontrola) lub w obecności 2,5 mM ortofosforanu.

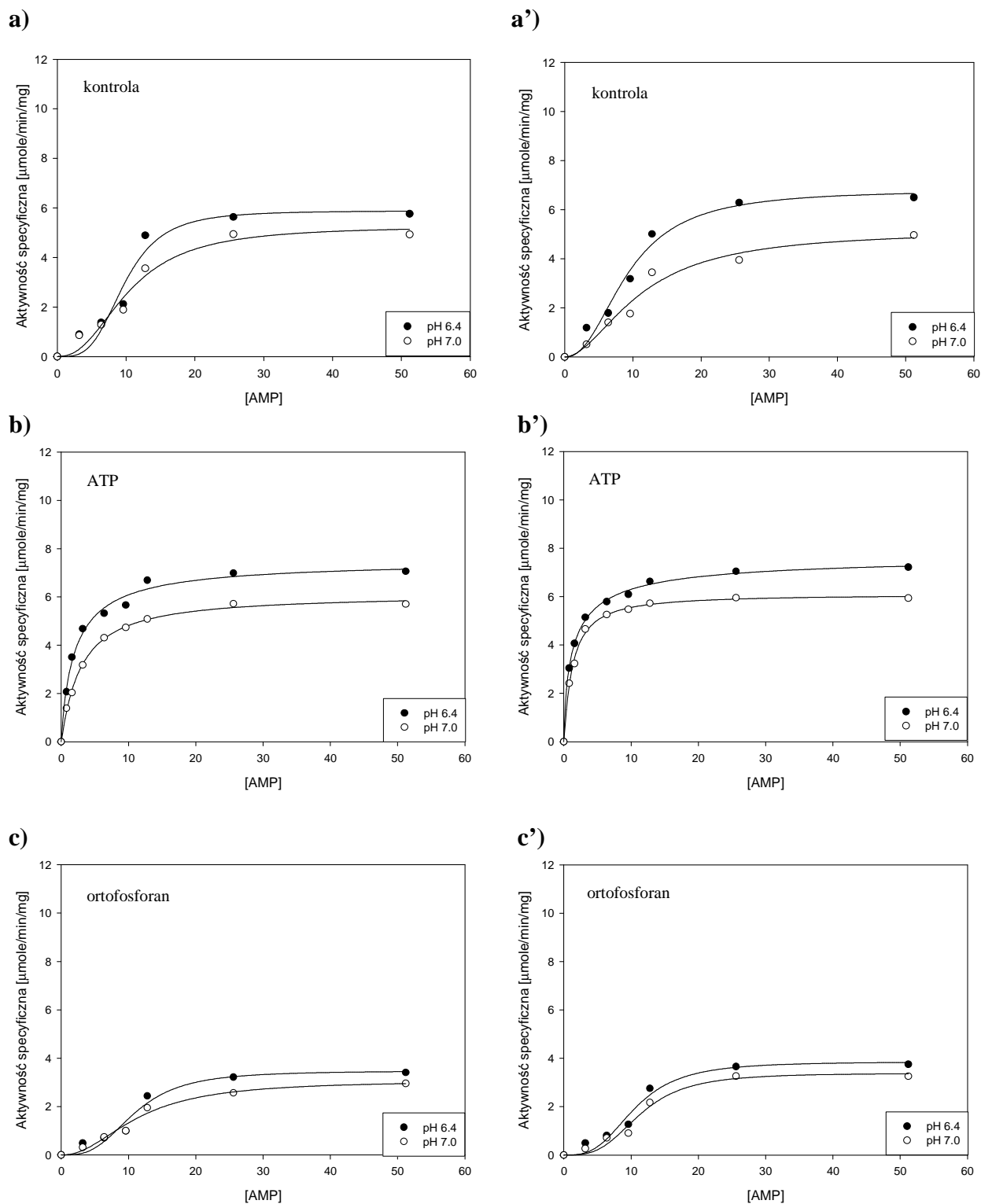
Przedstawione wartości aktywności stanowią średnie z trzech niezależnych pomiarów. Wartości S.D. mieściły się w zakresie ± 10 % wartości wyliczonych średnich.

Rycina 20 przedstawia krzywe kinetyczne wysycenia enzymu substratem dla reakcji katalizowanej przez deaminazę AMP łożyska ludzkiego przechowywaną pięć dni w temperaturze 4⁰C, mierzonej w pH lekko kwaśnym (6,4) i obojętnym, w środowisku zawierającym 100 mM lub 200 mM chlorek potasu oraz efektor (1 mM ATP lub 2,5 mM ortofosforan).

Jak to wynika z przedstawionych wykresów, w porównaniu z krzywymi kinetycznymi wykreślonymi dla enzymu „świeżego” (Ryc. 12), zaobserwowane zmiany w profilu krzywych były nieznaczne. Różnice dotyczyły jedynie wartości liczbowych parametrów kinetycznych reakcji ($S_{0,5}$, V_{max} i n_H) (Tabela III), co wynikało w głównej mierze z niższej aktywności enzymu „przechowywanego”.

Dodanie do środowiska inkubacyjnego 1 mM ATP (Ryc. 20b,b') w obydwu badanych pH wyraźnie enzym „przechowywany” uaktywniło, a wykreślone w obecności tego efektora krzywe kinetyczne, tak jak w przypadku enzymu „świeżego” (Ryc. 12b,b'), miały profil hiperboliczny.

Również dodanie do środowiska inkubacyjnego 2,5 mM ortofosforanu (Ryc. 20c,c') nie zmieniło znacząco profili kinetycznych obserwowanej reakcji. Niezależnie od pH środowiska oraz stężenia jonów potasowych profile te były podobne do wykreślonych dla enzymu „świeżego” (Ryc. 12c,c'). Zmniejszeniu uległy jedynie wartości parametrów kinetycznych ($S_{0,5}$, V_{max} i n_H) reakcji katalizowanej przez enzym „przechowywany” (Tabela III).



Ryc. 20. Deaminaza AMP łożyska ludzkiego – krzywe kinetyczne wysycenia substratem enzymu „przechowywanego”.

Aktywność enzymu mierzono w 0,1 M buforze kakodylanowym o pH 6,4 i 7,0, w obecności 100 mM (a,b,c) oraz 200 mM (a',b',c') chlorku potasu, ewentualnie z dodatkiem 1 mM ATP (b,b') lub 2,5 mM ortofosforanu (c,c'). Do próbdodawano 5 μg enzymu.

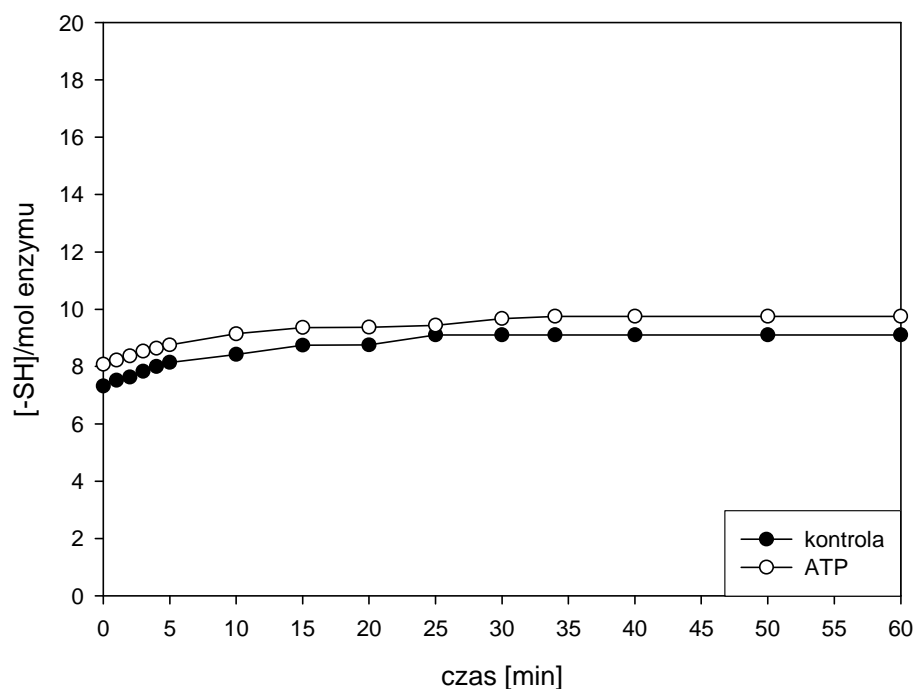
Tabela III Wpływ pH, stężenia jonów potasowych, ATP i ortofosforanu na parametry kinetyczne reakcji katalizowanej przez „przechowywany” preparat deaminazy AMP łożyska ludzkiego

Dodany efektor	pH 6,4			pH 7,0		
	S _{0,5}	n _H	V _{max}	S _{0,5}	n _H	V _{max}
kontrola (100 mM KCl)	11,5	2,7	8,5	19,8	1,8	7,9
kontrola (200 mM KCl)	12,3	2,9	9,5	14,2	2,0	8,8
1 mM ATP (100 mM KCl)	5,1	0,9	10,9	2,7	1,0	8,0
1 mM ATP (200 mM KCl)	6,8	0,8	12,9	2,5	0,8	8,5
2,5 mM ortofosforan (100 mM KCl)	12,1	2,17	6,3	15,5	1,6	7,0
2,5 mM ortofosforan (200 mM KCl)	15,2	2,1	8,8	13,2	1,8	6,9

Wartości przedstawione w Tabeli stanowią średnią trzech doświadczeń.
Wartości S.D. mieściły się w zakresie $\pm 10\%$ wartości wyliczonych średnich.

5.4.3 Pomiar reaktywnych grup sulfhydrylowych

Rycina 21 ilustruje przebieg miareczkowania DTNB preparatu deaminazy AMP z łożyska ludzkiego przechowywanego pięć dni w temperaturze 4°C. Jak to wynika z przedstawionej Ryciny, miareczkowanie enzymu „przechowywanego” ujawniło obecność 9 (w przeliczeniu na mol enzymu) reaktywnych grup sulfhydrylowych. Pierwsze 7 grup reagowało z odczynnikiem natychmiast, pozostałe ujawniły się natomiast w ciągu kolejnych 25 minut miareczkowania. Dodanie do środowiska inkubacyjnego 1 mM ATP zredukowało liczbę reagujących natychmiast grup sulfhydrylowych do 8. Po 30 minutach dalszego miareczkowania ujawniła się kolejna, 9 grupa.

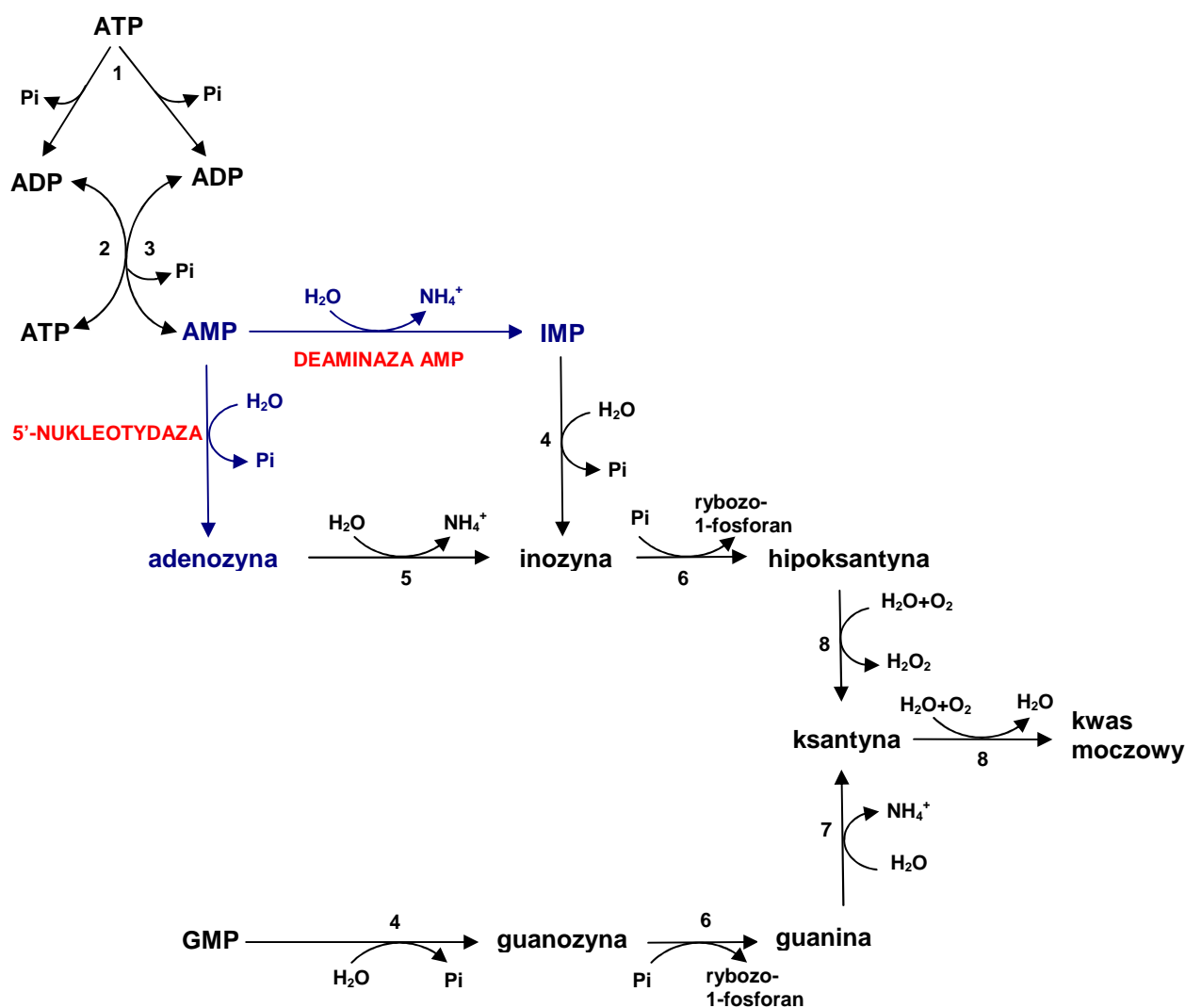


Ryc. 21. Deaminaza AMP łożyska ludzkiego – miareczkowanie DTNB reaktywnych grup sulfhydrylowych enzymu „przechowywanego”.

Mieszanina reagująca zawierała 0,7 mg enzymu rozpuszczonego w 1 ml 0,05 M buforu fosforanowego z dodatkiem 200 μ M DTNB oraz, ewentualnie, 1 mM ATP.

6. DYSKUSJA

Degradacja AMP w tkankach ssaków kontrolowana jest przez dwa konkurujące o wspólny substrat enzymy: deaminazę AMP oraz 5'-nukleotydazę. Enzymy te podlegają precyzyjnej regulacji, syntetyzując w zależności od aktualnych metabolicznych potrzeb (69), odpowiednio IMP lub adenozyne (Ryc. 22). Ta ostatnia posiada silne działanie farmakologiczne i odgrywa istotną rolę w regulacji ukrwienia tkanek.



Ryc. 22. Metabolizm ATP w tkankach ludzkich.

1 – ATPaza, 2- kinaza adenylanowa, 3- fosfataza, 4– 5'-nukleotydaza-II, 5 – deaminaza adenozyne, 6 – fosforylaza nukleozydu purynowego, 7 – guanaza, 8 – oksydaza ksantynowa.

Z prowadzonych w latach osiemdziesiątych ubiegłego wieku badań Sim i Maguire (70) wynika, że w łożysku ludzkim aktywność 5'-nukleotyduazy, jest wysoka i przewyższa znajdowaną tam aktywność deaminazy AMP. Pozwoliło to postawić hipotezę o znaczeniu katalizowanej przez 5'-nukleotyduazę reakcji dla regulacji przepływu krwi w łożysku ludzkim (71). W okresie tamtych wiadomości na temat 5'-nukleotyduazy, jej składu izozymowego, dystrybucji tkankowej, kompartmentacji komórkowej oraz właściwości kinetyczno-regulacyjnych były jednak niepełne. Obecnie wiadomo, że spośród siedmiu, znajdujących w tkankach ssaków izozymów 5'-nukleotyduazy, lokalizację cytozolową posiadają jedynie cztery (60). Jednakże tylko jeden z nich (cN-I), ze względu na swoje preferencje substratowe oraz właściwości kinetyczno-regulacyjne (62), mógłby w katabolizmie łożyskowego AMP uczestniczyć w sposób efektywny. Z przedstawionych w rozprawie badań wynika jednak, że ekspresja genu *CN-1* (Ryc. 5) w tkance tej nie zachodzi i że izozym cN-I w łożysku ludzkim nie jest syntetyzowany. Może to wskazywać na bardziej istotny niż zakładano udział deaminazy AMP w degradacji łożyskowego AMP.

Aktywność deaminazy AMP w homogenacie łożyska ludzkiego wynosi 0,02 mikromola/min/mg białka (Tabela I) i nie różni się od tej znajdującej w homogenatach ludzkiej wątroby (72) czy nerki (7).

Z przedstawionych badań wynika także, że w dojrzałym łożysku ludzkim zachodzi jedynie ekspresja genów *AMPD2* i *AMPD3*, kodujących odpowiednio izoformy deaminazy AMP wątrobową i erytrocytarną (Ryc. 3). Ekspresja genu kodującego izoformę wątrobową jest jednak dominująca (Ryc. 4) i ona wyznacza poziom aktywności deaminazy AMP w tej tkance.

Obecność dwóch chromatograficznie odmiennych izoform deaminazy AMP w eluacie z fosfocelulozy (Ryc. 6) potwierdza wyniki przedstawione na Rycinie 3. Wiązana przez fosfocelulozę słabiej i wypływająca w pierwszym szczycie aktywności deaminaza AMP jest zapewne izozymem erytrocytarnym. Deaminaza AMP wiązana przez podłoże silniej i wypływająca w drugim,

zasadniczym szczycie aktywności enzymu, jest natomiast izozymem wątrobowym. Wskazują na to właściwości fizykochemiczne i immunologiczne, jakie prezentuje (8).

Wyniki przedstawione na Rycinach 9-12 dowodzą dużej wrażliwości enzymu łożyskowego na zmiany stężenia jonów wodorowych. Z tego, że optimum aktywności enzymu przypada na pH 6,4 (Ryc. 9) można wnosić, że zachodząca w warunkach niedotlenienia i zakwaszenia łożyska degradacja ATP (Ryc. 22) odbywać się może przy istotnym udziale deaminazy AMP.

Deaminaza AMP łożyska ludzkiego jest również wrażliwa na zmiany stężeń jonów potasowych. Enzym łożyskowy zarówno w pH lekko kwaśnym (Ryc. 10a), jak i obojętnym (Ryc. 10b) jest najbardziej aktywny, w stężeniach jonów potasowych bliskich stężeniu fizjologicznemu. W obydwu tych pH aktywujący wpływ ATP jest bardzo wyraźnie zaznaczony (Ryc. 10a,b). W stężeniach jonów potasowych powyżej 200 mM wpływ ten jednak słabnie, a nawet zanika. Wyraźny w pH obojętnym (Ryc. 11b) hamujący wpływ ortofosforanu, w pH lekko kwaśnym (Ryc. 11a) jest tylko słabo zaznaczony i mało wyraźny.

Masa „podjednostkowa” enzymu wyizolowanego z wątroby ludzkiej wynosi 68 kDa (52) i różni się znacząco (Tabela IV) od masy „podjednostkowej” enzymu wyliczonej z sekwencji nukleotydowej (19).

Przyczyną powyższych różnic jest zachodząca w trakcie izolacji i oczyszczania enzymu proteoliza (74).

Z przeprowadzonych niedawno badań wynika bowiem, że izolacji i oczyszczaniu enzymu tkankowego towarzyszy zawsze proteoliza jego labilnego fragmentu N-końcowego (24,75). Utrata tego fragmentu wiąże się ze znaczącą redukcją masy „podjednostkowej” enzymu (Tabela IV).

Tabela IV Porównanie mas cząsteczkowych izoformy wątrobowej deaminazy AMP

WARIANT IZOFORMY WĄTROBOWEJ	Masa cząsteczkowa podjednostki	
	Wyznaczona doświadczalnie (21,73)	Wyliczona na podstawie sekwencji nukleotydowej transkryptów kodujących (19)
1A/2	68 kDa	92 kDa
1B/2	83-85 kDa	101 kDa
1B/3	68 kDa	93 kDa

Proteolizie takiej ulega z pewnością również enzym łożyskowy. Wyniki elektroforezy (Ryc. 8) identyfikujące w żelu poliakrylamidowym białko o zredukowanej masie cząsteczkowej (68 kDa), słuszność powyższego potwierdzają.

Wyniki sączenia molekularnego (Ryc. 15) wskazują, że deaminaza AMP łożyska ludzkiego, podobnie jak enzym wątrobowy, występować może w postaci różnych, aktywnych konformacji agregacyjnych. Czynnikiem modulującym agregację enzymu, poza pH i stężeniem jonów potasowych, są najpewniej również jego efekторы. Jak to pokazuje Rycina 15, obecność ATP tendencje agregacyjne enzymu stymuluje, powodując pojawienie się w eluacie z kolumny dodatkowych, bardziej zagregowanych form enzymu o wyższych masach cząsteczkowych.

Zarówno w pH optymalnym (pH 6,4), jak i w pH 7,0, reakcja katalizowana przez deaminazę AMP, mierzona w obecności 100 lub 200 mM chlorku potasu, przebiega wedle kinetyki sigmoidalnej (Ryc. 12a,a'). Obecny w środowisku 2,5 mM ortofosforan, nie zmieniając sigmoidalnego charakteru tej kinetyki, aktywność deaminazy AMP nieznacznie hamuje, zaś 1 mM ATP

kinetykę tą zmienia na hiperboliczną. Następstwem obecności tego ostatniego jest wyraźne obniżenie wartości stałej półwysycenia enzymu substratem ($S_{0,5}$) (Tabela II).

Obecna w świeżym preparacie deaminaza AMP nie jest stabilna i w trakcie pięciodniowego przechowywania w temperaturze 4°C ulega degradacji i dezagregacji (Ryc. 16). Reprezentujące zredukowaną podjednostkę enzymu białko o masie 68 kDa w ciągu okresu przechowywania stopniowo zanika, a procesowi temu towarzyszy narastająca akumulacja białek o niższych masach cząsteczkowych (Ryc. 16).

Wyniki przedstawione w Tabeli III pokazują, że opisanemu powyżej zjawisku towarzyszy spadek aktywność oraz modyfikacja właściwości kinetycznych enzymu. Spadkom aktywności deaminazy AMP towarzyszy obniżenie szybkości maksymalnej reakcji enzymatycznej (V_{max}), wzrost wartości stałej półwysycenia enzymu substratem ($S_{0,5}$) (Tabela III), a także zmniejszenie liczby przypadających na mol enzymu reaktywnych grup sulfhydrylowych. Przechowywany pięć dni w 4°C enzym łożyskowy zawierał już tylko połowę tych grup (Ryc. 21), jakie prezentowała świeżo wypreparowana z łożyska ludzkiego deaminaza AMP (Ryc. 13).

Przedstawione w rozprawie wyniki doświadczalne dowodzą, że deaminaza AMP łożyska ludzkiego jest enzymem o aktywności regulowanej przez różnorodne, złożone mechanizmy regulacyjne. W prawidłowym ich funkcjonowaniu stężenia jonów wodorowych i potasowych wydają się pełnić rolę zasadniczą.

7. WNIOSKI

- 1) W dojrzałym łożysku ludzkim ma miejsce ekspresja genów *AMPD2* i *AMPD3*, syntetyzujących izozymy wątrobowy (L) i erytrocytarny (E) deaminazy AMP. Ekspresja genu *AMPD2* jest dominująca i generuje w zasadniczym stopniu aktywność deaminazy AMP w tej tkance.
- 2) W regulacji aktywności deaminazy AMP w łożysku ludzkim istotną rolę odgrywają zmiany stężeń jonów wodorowych i potasowych.
- 3) Deaminaza AMP w łożysku ludzkim występuje w postaci różnie zagregowanych, aktywnych form molekularnych. Ich liczba oraz stopień agregacji modyfikowane są obecnością efektorów allosterycznych enzymu, np. ATP.
- 4) Podczas przechowywania w 4⁰C, deaminaza AMP ulega dezagregacji i degradacji, a procesowi temu towarzyszy zmiana właściwości katalitycznych i kinetyczno–regulacyjnych enzymu.

8. STRESZCZENIE

Deaminaza AMP jest enzymem przemian puryn, pełniącym istotną rolę w regulacji metabolizmu energetycznego komórki.

Celem prezentowanej pracy doktorskiej było zbadanie wpływu zmian stężenia jonów wodorowych i potasowych na właściwości kinetyczno-regulacyjne enzymu wyizolowanego z łożyska ludzkiego.

W wyniku przeprowadzonych badań wykazano, że spośród genów rodziny *AMPD*, w dojrzałym łożysku ludzkim zachodzi jedynie ekspresja genów *AMPD2* oraz *AMPD3*, kodujących odpowiednio izozymy wątrobowy i erytrocytarny deaminazy AMP. Nie wykazano natomiast ekspresji genów *AMPD1*, kodującego izoformę mięśniową deaminazy AMP oraz *CN-1*, kodującego cytozolowy, AMP-preferujący izozym 5'-nukleotydazy. Sugeruje to znaczniejszy niż przypuszczano udział deaminazy AMP w degradacji kwasu adenyłowego w tej tkance.

Z przeprowadzonych badań wynika, że w dojrzałym łożysku ludzkim aktywność deaminazy AMP związana jest głównie z jej izozymem wątrobowym (*AMPD2*). Na regulację jego aktywności, obok obecności efektorów allosterycznych (jak ATP i ortofosforan), zasadniczy wpływ wywierają także zmiany stężeń jonów wodorowych i potasowych. Dla łożyskowej deaminazy AMP optimum aktywności przypada na pH 6,4, zaś optymalne dla tego pH stężenie jonów potasowych wynosi około 200 mM. Aktywność enzymu hamują wyższe stężenia jonów potasowych. W pH obojętnym aktywność enzymu jest niższa niż w pH lekko kwaśnym, jednakże zmian jakościowych we właściwościach regulacyjnych enzymu nie obserwuje się.

Sączenie molekularne na Sepharozie CL-6B wykazało w eluacie z kolumny obecność różnie zagregowanych, aktywnych form enzymu. Dodanie do buforu elucyjnego ATP spowodowało wzrost aktywności łożyskowej

deaminazy AMP oraz pojawienie się w eluacie dodatkowych, bardziej zagregowanych form enzymu.

W obydwu badanych pH, w obecności 100 i 200 mM stężenia chlorku potasu, deaminaza AMP łożyska ludzkiego wykazuje kinetykę sigmoidalną, ulegającą w obecności ortofosforanu nieznacznemu pogłębieniu, zaś w obecności ATP hiperbolizacji.

Właściwości świeżo wypreparowanej deaminazy AMP łożyska ludzkiego zmieniają się w trakcie przechowywania enzymu w 4⁰C, a parametry kinetyczne ($S_{0,5}$ i V_{max}) reakcji enzymatycznej zależą od stopnia „świeżości” enzymu. Pięciodniowemu przechowywaniu enzymu towarzyszy spadek aktywności oraz redukcja liczby, przypadających na mol enzymu, reaktywnych grup sulfhydrylowych.

Przedstawione w pracy wyniki wykazują dużą plastyczność właściwości regulacyjnych deaminazy AMP łożyska ludzkiego i wskazują na jej możliwości adaptacyjne do zmieniających się warunków metabolicznych.

9. PIŚMIENNICTWO

1. **Purzycka, J.** 1962. AMP and adenosine aminohydrolases in rat tissues. *Acta Biochim.Pol.* **9**:83-93.
2. **Lowenstein, J. and K. Tornheim.** 1971. Ammonia production in muscle: the purine nucleotide cycle. *Science* **171**:397-400.
3. **Aragon, J. J. and J. M. Lowenstein.** 1980. The purine-nucleotide cycle. Comparison of the levels of citric acid cycle intermediates with the operation of the purine nucleotide cycle in rat skeletal muscle during exercise and recovery from exercise. *Eur.J.Biochem.* **110**:371-377.
4. **Tornheim, K. and J. M. Lowenstein.** 1975. The purine nucleotide cycle. Control of phosphofructokinase and glycolytic oscillations in muscle extracts. *J.Biol.Chem.* **250**:6304-6314.
5. **Aragon, J. J., K. Tornheim, and J. M. Lowenstein.** 1980. On a possible role of IMP in the regulation of phosphorylase activity in skeletal muscle. *FEBS Lett.* **117 Suppl**:K56-K64.
6. **Paul, R. J.** 1989. Smooth muscle energetics. *Annu.Rev.Physiol* **51**:331-349.
7. **Nowak, G. and K. Kaletha.** 1992. Purification and properties of AMP-deaminase from human kidney. *Biochem.Med.Metab Biol.* **47**:232-241.
8. **Swieca, A., I. Rybakowska, G. Nagel-Starczynowska, E. Kosowska, and K. Kaletha.** 2003. AMP-deaminase from human term placenta. *Mol.Cell Biochem.* **252**:363-367.
9. **Chapman, A. G. and D. E. Atkinson.** 1973. Stabilization of adenylate energy charge by the adenylate deaminase reaction. *J.Biol.Chem.* **248**:8309-8312.
10. **Lowenstein, J. M.** 1972. Ammonia production in muscle and other tissues: the purine nucleotide cycle. *Physiol Rev.* **52**:382-414.
11. **Atkinson, D. E.** 1968. The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. *Biochemistry* **7**:4030-4034.
12. **Morisaki, T., R. L. Sabina, and E. W. Holmes.** 1990. Adenylate deaminase. A multigene family in humans and rats. *J.Biol.Chem.* **265**:11482-11486.
13. **Sabina, R. L., T. Morisaki, P. Clarke, R. Eddy, T. B. Shows, C. C. Morton, and E. W. Holmes.** 1990. Characterization of the human and rat myoadenylate deaminase genes. *J.Biol.Chem.* **265**:9423-9433.
14. **Mineo, I., P. R. Clarke, R. L. Sabina, and E. W. Holmes.** 1990. A novel pathway for alternative splicing: identification of an RNA intermediate that generates an alternative 5' splice donor site not present in the primary transcript of AMPD1. *Mol.Cell Biol.* **10**:5271-5278.

15. **Mineo, I. and E. W. Holmes.** 1991. Exon recognition and nucleocytoplasmic partitioning determine AMPD1 alternative transcript production. *Mol.Cell Biol.* **11**:5356-5363.
16. **Mahnke-Zizelman, D. K. and R. L. Sabina.** 2001. Localization of N-terminal sequences in human AMP deaminase isoforms that influence contractile protein binding. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **285**:489-495.
17. **Mahnke-Zizelman, D. K. and R. L. Sabina.** 1992. Cloning of human AMP deaminase isoform E cDNAs. Evidence for a third AMPD gene exhibiting alternatively spliced 5'-exons. *J.Biol.Chem.* **267**:20866-20877.
18. **Bausch-Jurken, M. T., D. K. Mahnke-Zizelman, T. Morisaki, and R. L. Sabina.** 1992. Molecular cloning of AMP deaminase isoform L. Sequence and bacterial expression of human AMPD2 cDNA. *J.Biol.Chem.* **267**:22407-22413.
19. **van den, B. F. and R. L. Sabina.** 1995. Characterization of human AMP deaminase 2 (AMPD2) gene expression reveals alternative transcripts encoding variable N-terminal extensions of isoform L. *Biochem.J.* **312**:401-410.
20. **Ogasawara, N., H. Goto, Y. Yamada, and T. Watanabe.** 1978. Distribution of AMP-deaminase isozymes in rat tissues. *Eur.J.Biochem.* **87**:297-304.
21. **Ogasawara, N., H. Goto, Y. Yamada, T. Watanabe, and T. Asano.** 1982. AMP deaminase isozymes in human tissues. *Biochim.Biophys.Acta* **714**:298-306.
22. **Gross, M., H. Morisaki, T. Morisaki, and E. W. Holmes.** 1994. Identification of functional domains in AMPD1 by mutational analysis. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **205**:1010-1017.
23. **Mahnke-Zizelman, D. K. and R. L. Sabina.** 2002. N-terminal sequence and distal histidine residues are responsible for pH-regulated cytoplasmic membrane binding of human AMP deaminase isoform E. *J.Biol.Chem.* **277**:42654-42662.
24. **Sabina, R. L. and D. K. Mahnke-Zizelman.** 2000. Towards an understanding of the functional significance of N-terminal domain divergence in human AMP deaminase isoforms. *Pharmacol.Ther.* **87**:279-283.
25. **Mahnke-Zizelman, D. K., P. C. Tullson, and R. L. Sabina.** 1998. Novel aspects of tetramer assembly and N-terminal domain structure and function are revealed by recombinant expression of human AMP deaminase isoforms. *J.Biol.Chem.* **273**:35118-35125.
26. **Sabina, R. L., R. Marquetant, N. M. Desai, K. Kaletha, and E. W. Holmes.** 1987. Cloning and sequence of rat myoadenylate deaminase cDNA. Evidence for tissue-specific and developmental regulation. *J.Biol.Chem.* **262**:12397-12400.
27. **Lee, Y. P.** 1957. 5'-Adenylic acid deaminase. I. Isolation of the crystalline enzyme from rabbit skeletal muscle. *J.Biol.Chem.* **227**:987-992.

28. **Smiley, K. L., Jr., A. J. Berry, and C. H. Suelter.** 1967. An improved purification, crystallization, and some properties of rabbit muscle 5'-adenylic acid deaminase. *J.Biol.Chem.* **242**:2502-2506.
29. **Ellis, K. J., K. Kuntz, and J. M. Sturtevant.** 1971. The activation of muscle adenylate deaminase by substrate. *J.Biol.Chem.* **246**:6631-6637.
30. **Ashman, L. K. and J. L. Atwell.** 1972. AMP deaminase from rabbit skeletal muscle: the effect of monovalent cations on catalytic activity and molecular weight. *Biochim.Biophys.Acta* **258**:618-625.
31. **Smiley, K. L. and C. H. Suelter.** 1967. Univalent cations as allosteric activators of muscle adenosine 5'-phosphate deaminase. *J.Biol.Chem.* **242**:1980-1981.
32. **Ronca, G., A. Raggi, and S. Ronca-Testoni.** 1972. Muscle AMP aminohydrolase. X. Effect of anions on the kinetic and regulatory properties of the rat muscle enzyme. *Ital.J.Biochem.* **21**:305-321.
33. **Tomozawa, Y. and R. Wolfenden.** 1970. Binding of guanosine triphosphate and adenosine triphosphate by rabbit muscle adenosine monophosphate deaminase. *Biochemistry* **9**:3400-3404.
34. **Wheeler, T. J. and J. M. Lowenstein.** 1979. Adenylate deaminase from rat muscle. Regulation by purine nucleotides and orthophosphate in the presence of 150 mM KCl. *J.Biol.Chem.* **254**:8994-8999.
35. **Hisatome, I., T. Morisaki, H. Kamma, T. Sugama, H. Morisaki, A. Ohtahara, and E. W. Holmes.** 1998. Control of AMP deaminase 1 binding to myosin heavy chain. *Am.J.Physiol* **275**:C870-C881.
36. **Ronca-Testoni, S., A. Raggi, and G. Ronca.** 1970. Muscle AMP aminohydrolase. 3. A comparative study on the regulatory properties of skeletal muscle enzyme from various species. *Biochim.Biophys.Acta* **198**:101-112.
37. **Coffee, C. J. and C. Solano.** 1977. Rat muscle 5'-adenylic acid aminohydrolase. Role of K⁺ and adenylate energy charge in expression of kinetic and regulatory properties. *J.Biol.Chem.* **252**:1606-1612.
38. **Coffee, C. J.** 1978. AMP deaminase from rat skeletal muscle. *Methods Enzymol.* **51:490-7**:490-497.
39. **Kaletha, K.** 1976. Potassium-dependent thermal sensibility of AMP-deaminase from rabbit skeletal muscle. *Acta Biochim.Pol.* **23**:193-201.
40. **Kaletha, K., A. Skladanowski, and M. Zydowo.** 1978. Temperature- and pH-induced changes of the enzyme-substrate affinity and the reaction velocity catalysed by rabbit skeletal muscle AMP-Deaminase. *Int.J.Biochem.* **9**:97-101.
41. **Ranieri-Raggi, M., C. Bergamini, and A. Raggi.** 1980. Effect of pH on the kinetic properties of rat skeletal muscle AMP deaminase. *Ital.J.Biochem.* **29**:238-250.

42. **Coffee, C. J. and W. A. Kofke.** 1975. Rat muscle 5'-adenylic acid aminohydrolase. I. Purification and subunit structure. *J.Biol.Chem.* **250**:6653-6658.
43. **Ranieri-Raggi, M. and A. Raggi.** 1984. Effect of pH and KCl on aggregation state and sulphhydryl groups reactivity of rat skeletal muscle AMP deaminase. *Ital.J.Biochem.* **33**:155-176.
44. **Ranieri-Raggi, M. and A. Raggi.** 1979. Regulation of skeletal muscle AMP deaminase: effects of limited proteolysis on the activity of the rabbit enzyme. *FEBS Lett.* **102**:59-63.
45. **Ranieri-Raggi, M. and A. Raggi.** 1980. Effects of storage on activity and subunit structure of rabbit skeletal-muscle AMP deaminase. *Biochem.J.* **189**:367-368.
46. **Raggi, A., M. Ranieri, G. Ronca, and C. A. Rossi.** 1972. Muscle AMP aminohydrolase. 8. The reactivity of the sulphhydryl groups of rat muscle AMP deaminase. *Biochim.Biophys.Acta* **271**:102-113.
47. **Ranieri-Raggi, M. and A. Raggi.** 1984. Effect of pH and KCl on aggregation state and sulphhydryl groups reactivity of rat skeletal muscle AMP deaminase. *Ital.J.Biochem.* **33**:155-176.
48. **Kaletha, K., A. Skladanowski, S. Bogdanowicz, and M. Zydowo.** 1979. Purification and some regulatory properties of human heart adenylate deaminase. *Int.J.Biochem.* **10**:925-929.
49. **Purzycka-Preis, J., E. Prus, M. Wozniak, and M. Zydowo.** 1978. Modification by liposomes of the adenosine triphosphate-activating effect on adenylate deaminase from pig heart. *Biochem.J.* **175**:607-612.
50. **Makarewicz, W.** 1974. Purification and properties of AMP-aminohydrolase from human placenta. *Acta Biochim.Pol.* **21**:125-135.
51. **Spychala, J.** 1984. Comparative study on vertebrate liver AMP deaminases. *Comp Biochem.Physiol B* **78**:881-884.
52. **Szydłowska, M., G. Nagel-Starczynowska, I. Rybakowska, A. Swieca, and K. Kaletha.** 2002. Human liver AMP-deaminase--oligomeric forms of the enzyme. *Mol.Cell Biochem.* **241**:81-86.
53. **Szydłowska, M., Z. Sledzinski, M. Krzyzanowski, G. Nagel-Starczynowska, and K. Kaletha.** 2004. Comparative immunologic and kinetic evaluation of AMP-deaminase isolated from normal human liver and hepatocellular carcinoma (HCC). *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **23**:1537-1539.
54. **Smith, L. D. and D. E. Kizer.** 1969. Purification and properties of rat liver AMP deaminase. *Biochim.Biophys.Acta* **191**:415-424.
55. **Marszalek, J., J. Spychala, and M. M. Zydowo.** 1989. Comparison of kinetic and regulatory properties of high S0.5 form of AMP deaminase from chicken and pigeon liver with AMP deaminase from rat and ox liver. *Comp Biochem.Physiol B* **94**:555-560.

56. **Szydłowska, M., Z. Chodorowski, I. Rybakowska, G. Nagel-Starczynowska, and K. Kaletha.** 2004. Full-size form of human liver AMP-deaminase? *Mol.Cell Biochem.* **266**:133-137.
57. **Hayashi, T. T. and P. S. Olmsted.** 1965. Estimation of adenylic acid deaminase in tissue extracts. *Anal.Biochem.* **10**:354-358.
58. **Makarewicz, W. and E. Mackowiak.** 1971. Adenosine-5'-monophosphate aminohydrolase of human placenta. *Acta Biochim.Pol.* **18**:135-142.
59. **Skladanowski, A. C. and A. C. Newby.** 1990. Partial purification and properties of an AMP-specific soluble 5'-nucleotidase from pigeon heart. *Biochem.J.* **268**:117-122.
60. **Bianchi, V. and J. Spychala.** 2003. Mammalian 5'-nucleotidases. *J.Biol.Chem.* **278**:46195-46198.
61. **Hunsucker, S. A., J. Spychala, and B. S. Mitchell.** 2001. Human cytosolic 5'-nucleotidase I: characterization and role in nucleoside analog resistance. *J.Biol.Chem.* **276**:10498-10504.
62. **Sala-Newby, G. B., A. C. Skladanowski, and A. C. Newby.** 1999. The mechanism of adenosine formation in cells. Cloning of cytosolic 5'-nucleotidase-I. *J.Biol.Chem.* **274**:17789-17793.
63. **Skladanowski, A. C., R. T. Smolenski, M. Tavenier, J. W. de Jong, M. H. Yacoub, and A. M. Seymour.** 1996. Soluble forms of 5'-nucleotidase in rat and human heart. *Am.J.Physiol* **270**:H1493-H1500.
64. **Nagel-Starczynowska, G., G. Nowak, and K. Kaletha.** 1991. Purification and properties of AMP-deaminase from human uterine smooth muscle. *Biochim.Biophys.Acta* **1073**:470-473.
65. **Chaney, A. L. and E. P. Marbach.** 1962. Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clin.Chem.* **8**:130-2.:130-132.
66. **Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* **72**:248-54.:248-254.
67. **Weber, K., J. R. Pringle, and M. Osborn.** 1972. Measurement of molecular weights by electrophoresis on SDS-acrylamide gel. *Methods Enzymol.* **26 PtC**:3-27.
68. **Chomczynski, P. and N. Sacchi.** 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal.Biochem.* **162**:156-159.
69. **Atkinson, D. E.** 1976. Adaptations of enzymes for regulation of catalytic function. *Biochem.Soc.Symp.* 205-223.
70. **Sim, M. K. and M. H. Maguire.** 1972. Presence of adenosine in the human term placenta. Determination of adenosine content and pathways of adenosine metabolism. *Circ.Res.* **31**:779-788.

71. **Maguire, M. H. and D. M. Aronson.** 1981. Measurement of human placental 5'-AMP deaminase activity by radiometric assay. *Anal.Biochem.* **116**:174-180.
72. **Dutka, P., M. Szydłowska, Z. Chodorowski, I. Rybakowska, G. Nagel-Starczynowska, and K. Kaletha.** 2004. AMP-deaminase from normal and cirrhotic human liver: a comparative study. *Mol.Cell Biochem.* **262**:119-126.
73. **Ashby, B. and H. Holmsen.** 1981. Platelet AMP deaminase. Purification and kinetic studies. *J.Biol.Chem.* **256**:10519-10523.
74. **Ranieri-Raggi, M. and A. Raggi.** 1979. Regulation of skeletal muscle AMP deaminase: effects of limited proteolysis on the activity of the rabbit enzyme. *FEBS Lett.* **102**:59-63.
75. **Haas, A. L. and R. L. Sabina.** 2003. N-terminal extensions of the human AMPD2 polypeptide influence ATP regulation of isoform L. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **305**:421-427.