

Iwona Maria Rybakowska

**WŁAŚCIWOŚCI DEAMINAZY AMP
W ONTOGENEZIE SERCA LUDZKIEGO**

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

Promotor:

Prof. dr hab. Krystian Kaletha

Gdańsk 2008

Rodzicom i Najbliższym z podziękowaniami

*Dziękuję Profesorowi Krystianowi Kaletha
oraz Koleżankom i Kolegom
z Katedry Biochemii, Biochemii Farmaceutycznej,
Biochemii i Fizjologii Klinicznej AMG
za cenne uwagi i okazaną pomoc.*

SPIS TREŚCI

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW.....	3
1. WSTĘP.....	5
1.1. DEAMINAZA AMP – WYSTĘPOWANIE, FORMY MOLEKULARNE, WŁAŚCIWOŚCI FIZYKOCHEMICZNE, ROLA METABOLICZNA	5
1.2. NIEDOBÓR MIEŚNIOWEJ DEAMINAZY AMP I JEGO ZNACZENIE METABOLICZNE	9
1.3. IZOFORMY DEAMINAZY AMP W MIOGENEZIE CZŁOWIEKA I SZCZURA	12
2. CEL PRACY.....	15
3. MATERIAŁY I METODY.....	16
3.1. PREPARATYKA DEAMINAZY AMP.....	16
3.1.1. MATERIAŁ TKANKOWY.....	16
3.1.2. OCZYSZCZANIE ENZYMU.....	16
3.1.2.1. PRZYGOTOWANIE FOSFOCELULOZY.....	16
3.1.2.2. CHROMAOGRAFIA ENZYMU NA FOSFOCELULOZIE P11.....	16
3.2. POMIARY KINETYCZNO-REGULACYJNE DEAMINAZY AMP.....	17
3.2.1. OZNACZANIE AKTYWNOŚCI ENZYMATYCZNEJ.....	17
3.2.2. OZNACZANIE STĘŻENIA BIAŁKA.....	18
3.2.3. OZNACZANIE PARAMETRÓW KINETYCZNYCH	18
3.2.4. GENEROWANIE ZMIAN ŁADUNKU ENERGETYCZNEGO ADENYLANÓW.....	19
3.3. ELEKTROFOREZA ENZYMU W ŻELU POLIAKRYLAMIDOWYM W WARUNKACH DENATURUJĄCYCH (SDS-PAGE).....	19
3.3.1 ROZDZIAŁ ELEKTROFORETYCZNY ENZYMU.....	19
3.3.2 BARWIENIE BIAŁEK W ŻELU POLIAKRYLAMIDOWYM BARWNIKIEM FAST COOMASIE	20
3.4. IDENTYFIKACJA ENZYMU METODĄ WESTERN BLOTTING.....	20
3.4.1. PRZYGOTOWANIE PRÓBEK.....	20

3.4.2. TRANSFER BIAŁEK Z ŻELU NA MEMBRANĘ.....	20
3.4.3. WESTERN BLOTTING.....	21
3.5. ANALIZA GENOTYPU <i>AMPD1</i>	22
3.6. ODCZYNNIKI I INNE MATERIAŁY.....	22
4. WYNIKI.....	24
4.1. WŁAŚCIWOŚCI CHROMATOGRAFICZNE ENZYMU.....	24
4.2. WŁAŚCIWOŚCI KINETYCZNO – REGULACYJNE IZOLOWANEGO ENZYMU.....	27
4.2.1. KINETYKA WYSYCENIA ENZYMU SUBSTRATEM.....	27
4.2.2. WPŁYW ZMIAN STĘŻENIA JONÓW WODOROWYCH (pH).....	35
4.2.3. WPŁYW ZMIAN WARTOŚCI ŁADUNKU ENERGETYCZNEGO ADENYLANÓW (łEA).....	36
4.3. SKŁAD PODJEDNOSTKOWY I ODPOWIEDŹ IMMUNOLOGICZNA ENZYMU	37
4.4. DEAMINAZA AMP SERCA LUDZKIEGO – WŁAŚCIWOŚCI ENZYMU WYZOLOWANEGO Z SERCA DZIECKA O ZMUTOWANYM GENOTYPIE <i>AMPD</i>	43
4.4.1. WŁAŚCIWOŚCI CHROMATOGRAFICZNE ENZYMU	43
4.4.2. WŁAŚCIWOŚCI KINETYCZNO – REGULACYJNE ENZYMU.....	45
4.4.2.1. KINETYKA WYSYCENIA ENZYMU SUBSTRATEM.....	45
4.4.2.2. WPŁYW ZMIAN STĘŻENIA JONÓW WODOROWYCH (pH).....	48
4.4.2.3. WPŁYW ZMIAN WARTOŚCI ŁADUNKU ENERGETYCZNEGO ADENYLANÓW (łEA).....	49
4.4.3. ROZDZIAŁ ELEKTROFORETYCZNY I ODPOWIEDŹ IMMUNOLOGICZNA ENZYMU	50
5. DYSKUSJA.....	55
6. WNIOSKI.....	60
7. STRESZCZENIE.....	61
8. PIŚMIENNICTWO.....	62

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

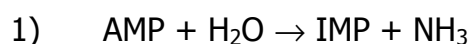
ADP	- adenozyno-5'-dwufosforan
AMP	- adenozyno-5'-monofosforan
AMPD	- deaminaza AMP
<i>ampd1</i>	- gen kodujący szczurzy izozym mięśniowy deaminazy AMP
<i>AMPD1</i>	- gen kodujący ludzki izozym mięśniowy deaminazy AMP
AMPD1	- izozym mięśniowy deaminazy AMP
<i>ampd2</i>	- gen kodujący szczurzy izozym wątrobowy deaminazy AMP
<i>AMPD2</i>	- gen kodujący ludzki izozym wątrobowy deaminazy AMP
AMPD2	- izozym wątrobowy deaminazy AMP
<i>ampd3</i>	- gen kodujący szczurzy izozym sercowy deaminazy AMP
<i>AMPD3</i>	- gen kodujący ludzki izozym erytrocytarny deaminazy AMP
AMPD3	- izozym erytrocytarny deaminazy AMP
APS	- nadsiarczan amonu
ATP	- adenozyno-5'-trójfosforan
c-d-N	- cytozolowa 5'(3')-deoksynukleotydaza
c-N-IA	- cytozolowa 5'-nukleotydaza IA
c-N-IB	- cytozolowa 5'-nukleotydaza IB
c-N-II	- cytozolowa 5'-nukleotydaza II
c-N-III	- cytozolowa 5'-nukleotydaza III
CDP-STAR	- sól sodowa 4-chloro-3-(metoksypiro[1,2-dioksotano3,2'{5'-chloro}tricyklo{3.3.1.1 ^{3,7} }dekado]-4-ilo)fenylofosforanu
DNA	- kwas deoksyrybonukleinowy
e-N	- ekto-5'-nukleotydaza
GTP	- guanozyno-5'-trójfosforan
IgG	- immunoglobulina klasy G
IMP	- inozyno-5'-monofosforan

kpz	- kilo par zasad
kDa	- kilodalton, 1000 j.m.a.
ŁEA	- ładunek energetyczny adenylanów
m-d-N	- mitochondrialna 5'(3')-deoksynukleotydaza
n_H	- współczynnik Hill'a
PAGE	- elektroforeza białek na żelu poliakrylamidowym
PBS	- bufor fosforanowy
PCR	- łańcuchowa reakcja polimerazy
pI	- punkt izoelektryczny
Pi	- fosforan nieorganiczny
PMSF	- fluorek fenylometylosulfonylu
PVDF	- difluorek poliwinylidenu
RFLP	- polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (ang. restriction fragment length polymorphism)
$S_{0.5}$	- stała półwysycenia enzymu substratem
SD	- odchylenie standardowe
SDS	- siarczan dodecyłu
SSCP	- polimorfizm konformacji jednoniciowych fragmentów DNA (ang. single stranded conformational polymorphism)
TEMED	- N, N, N', N' – tetraetylenodiamina
Tris	- tris(hydroksymetyl)aminometan
V_{max}	- szybkość maksymalna

1. WSTĘP

1.1. DEAMINAZA AMP – WYSTĘPOWANIE, FORMY MOLEKULARNE, WŁAŚCIWOŚCI FIZYKOCHEMICZNE, ROLA METABOLICZNA

Deaminaza AMP (AMPD, AMP-aminohydrolaza - EC 3.5.4.6) jest enzymem cytoplazmatycznym, katalizującym nieodwracalną, hydrolityczną reakcję deaminacji kwasu adenylogowego (AMP) do kwasu inozynowego (IMP) (reakcja 1):

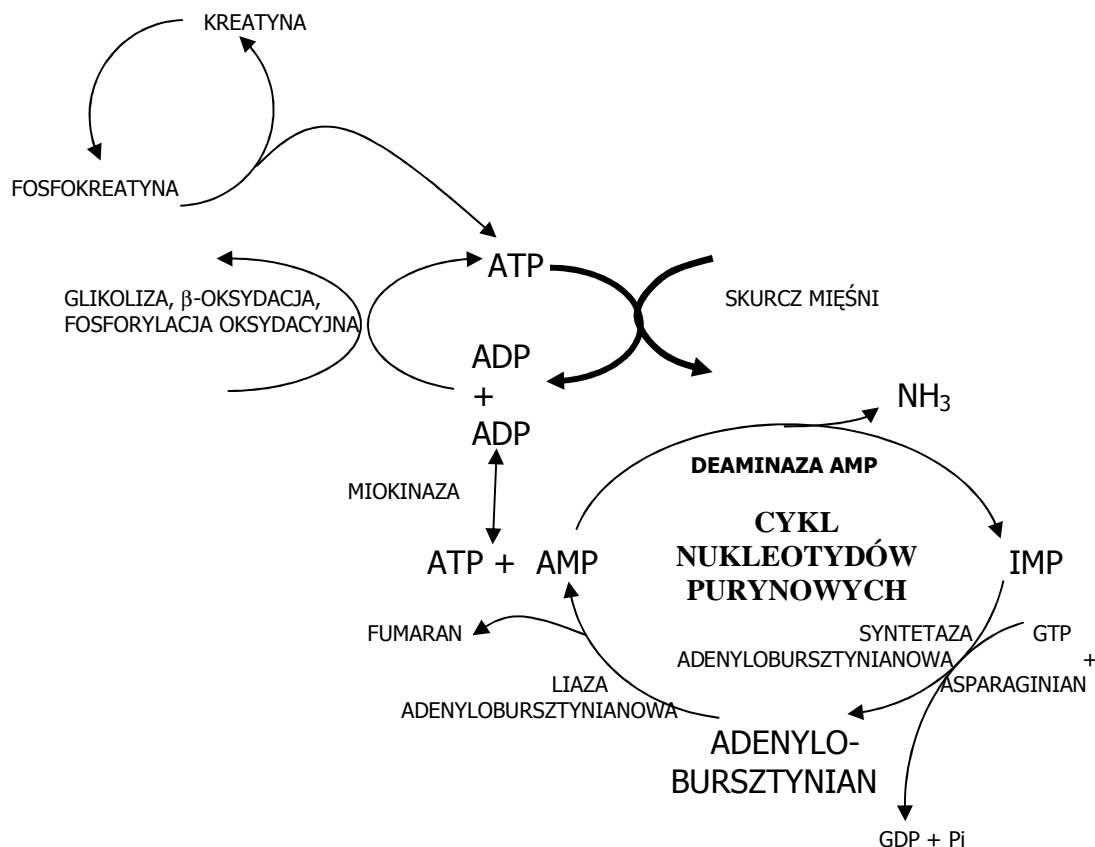


Enzym ten występuje powszechnie w tkankach zwierząt (1-6), a także u roślin (7) i grzybów (8,9). U człowieka i szczura deaminaza AMP kodowana jest przez rodzinę trzech niezależnych genów, odpowiedzialnych za syntezę izozymów: mięśniowego [u człowieka (M, AMPD1), u szczura (A, ampd1)]; wątrobowego [u człowieka (L, AMPD2), u szczura (B, ampd2)] oraz u człowieka erytrocytarnego (E, AMPD3) lub u szczura sercowego (C, ampd3) (10,11). Geny rodziny AMPD powstały najpewniej w wyniku duplikacji genu zawiązkowego i jego późniejszego różnicowania w kolejnych etapach filogenezy (11).

Izozymy AMPD zawierają w swej strukturze zarówno domeny konserwatywne jak i zmienne. Oprócz wykazującego znaczny (60-70%) stopień homologii fragmentu C-terminalnego (12,13), stanowiącego centrum katalityczne enzymu, posiadają one również zmienny i labilny fragment N-terminalny (10). Fragment ten wyznacza tkankowo specyficzne właściwości izoform (14), zaś jego proteoliza właściwości te modyfikuje (8,10,15-17).

Aktywność deaminazy AMP w mięśniach szkieletowych ssaków jest kilkunastokrotnie wyższa od aktywności w pozostałych tkankach (3,18,19).

W mięśniach szkieletowych ssaków znaczenie fizjologiczne reakcji katalizowanej przez deaminazę AMP wiąże się głównie z funkcjonowaniem cyklu nukleotydów purynowych (Ryc.1).



Rycina 1. Metabolizm nukleotydów purynowych w mięśniu szkieletowym (rycina zmodyfikowana na podstawie R.L. Sabina i J.L. Swain i inni J. Clin. Invest. 1984 (20)).

Związana z meromiozyną ciężką deaminaza AMP (21,22) oraz związana z aktyną syntaza adenylobursztynianowa (23) ulegają podczas skurczu mięśnia szkieletowego przestrzennemu zbliżeniu, umożliwiając w ten sposób cykliczną resyntezę AMP. Dodatkowe znaczenie cyklu nukleotydów purynowych dla metabolizmu energetycznego mięśnia szkieletowego wynika z jego roli anaplerotycznej związanej z wytwarzaniem fumaranu (24).

W mięśniu sercowym, w którym cykl nukleotydów purynowych nie funkcjonuje, rola fizjologiczna katalizowanej przez deaminazę AMP reakcji, polega głównie na utrzymaniu prawidłowych wartości ładunku energetycznego adenylanów (łEA) w komórce (25,26).

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

Degradowany przez deaminazę AMP kwas adenyłowy przesuwa w prawo równowagę reakcji katalizowanej przez miokinazę (EC 2.7.4.3) (reakcja 2) (25,27,28) co sprzyja odtworzeniu zużywającego się podczas skurczu mięśnia ATP i zapobiega w ten sposób jego niedoborowi, we wstępnym okresie aktywności ruchowej mięśnia (25,29-32).



Następnie, wewnątrzkomórkowe stężenie ATP podtrzymywane jest przez szybką defosforylację fosfokreatyny oraz przez wytwarzające ATP procesy kataboliczne takie jak glikoliza, glikogenoliza i β -oksydacja kwasów tłuszczowych. Glikoliza i glikogenoliza, dzięki roli jaką odgrywa AMP w aktywacji fosfofruktokinazy oraz fosforylasy b glikogenu, pozostają w bezpośredniej zależności z reakcją katalizowaną przez deaminazę AMP (33-36).

U ssaków aktywność deaminazy AMP w mięśniu sercowym jest wielokrotnie niższa niż w mięśniu szkieletowym. Deaminazę AMP z mięśnia serca ssaków wyizolowano po raz pierwszy z serca królika (37), a następnie serca świni (38), szczura (39) oraz wołu (40).

Deaminaza AMP z mięśnia szkieletowego w obecności fizjologicznych stężeń jonów potasu wykazuje hiperboliczną zależność wysycenia enzymu substratem. Natomiast enzym wyizolowany z serca, badany w tych samych warunkach, charakteryzuje się sigmoidalną kinetyką tej zależności. Zarówno ATP jak i ADP aktywują enzym, przekształcając kinetykę katalizowanej reakcji z sigmoidalnej w hiperboliczną. Obecność GTP i ortofosforanu hamuje aktywność enzymu sercowego, pogłębiając sigmoidalny charakter krzywej wysycenia enzymu substratem (39,40). Stymulujący wpływ nukleotydów adeninowych (APT i ADP), wzrasta w obecności liposomów. Obserwowane wówczas efekty modulacyjne dotyczą jedynie wyraźnego wzrostu szybkości maksymalnej reakcji i są obserwowane tylko w przypadku enzymu sercowego. Enzym wyizolowany z mięśni szkieletowych swych właściwości kinetyczno-regulacyjnych w obecności liposomów nie zmienia (38).

Deaminazę AMP z serca ludzkiego wyizolowano w roku 1979 (41). Zaadsorbowany na fosfocelulozie enzym, płukany 1 M roztworem chlorku potasu, wypływał z kolumny w jednym szczycie aktywności i w obecności 100 mM KCl

prezentował sigmoidalną kinetykę wysycenia enzymu substratem ze stałą półwysycenia około 7 mM. Obecność 1 mM ATP obniżała wartość stałej półwysycenia do około 3 mM, zmieniając jednocześnie kształt krzywej kinetycznej z sigmoidalnej na hiperboliczny. W przeciwieństwie do tego, obecność 2 mM ortofosforanu pogłębiała sigmoidalny charakter krzywej kinetycznej, podwyższając wartość stałej półwysycenia do około 8 mM (41). Badania późniejsze z zastosowaniem zmodyfikowanej procedury preparatywnej, polegającej na wstępnym płukaniu fosfocelulozy 0,4 M, a następnie 0,75 M roztworem KCl, oraz zastosowaniu 0,75-2 M gradientu chlorku potasu, uwidoczniły w wypływającym z kolumny eluacie dwie aktywności enzymatyczne. Pierwsza z nich, o niższej aktywności specyficznej, wypływała z kolumny podczas płukania 0,75 M roztworem KCl i reprezentowała formę enzymu częściowo zdegradowanego, o hiperbolicznej kinetyce wysycenia enzymu substratem. Aktywność druga, zasadnicza, wypływała z kolumny podczas płukania 0,75-2 M gradientem stężeń KCl i wykazywała kinetykę sigmoidalną, o stałej półwysycenia około 9 mM i silnie zaznaczonym regulacyjnym wpływie ATP, ADP i ortofosforanu (42).

Ekspresja genów rodziny *AMPD* w mięśniu sercowym wykazuje zróżnicowanie gatunkowe. W sercu ludzkim, w odróżnieniu od serca szczurzego, w którym ma miejsce jedynie ekspresja genu *ampd3* (kodującego izozym sercowy C), ekspresji ulegają wszystkie geny rodziny *AMPD*. Ekspresja genu *AMPD3*, syntetyzującego izozym erytrocytarny E wydaje się być jednak dominująca (13).

U człowieka gen *AMPD3* zlokalizowany jest w chromosomie 11p13, a jego ekspresja regulowana jest na poziomie transkrypcji, translacji, a także modyfikowana jest posttranslacyjnie (43). W wyniku alternatywnego składowania transkryptu pierwotnego w tkankach człowieka syntetyzowane mogą być cztery (1a, 1b, 1b-1c, 1c), różniące się liczbą par zasad transkrypty wtórne (43). Stosunki ilościowe poszczególnych transkryptów są zmienne i zależą od rodzaju tkanki, w której ekspresja ma miejsce. Geny *AMPD3* (ludzki) i *ampd3* (szczurzy) wykazują niemal 90% homologie, co wskazuje na podobną regulację ich ekspresji. To samo dotyczy sekwencji aminokwasowych ludzkiego izozymu erytrocytarnego (E) oraz szczurzego izozymu sercowego (C) (43). Pomimo chromatograficznych i immunologicznych podobieństw istniejących pomiędzy izoformami: ludzką M (*AMPD1*) i szczurzą A (*ampd1*) oraz ludzką L (*AMPD2*) i szczurzą B (*ampd2*), izoformy ludzka E (*AMPD3*) i szczurza C (*ampd3*) wykazują jednakże odmienne właściwości immunologiczne (43).

1.2. NIEDOBÓR MIĘŚNIOWEJ DEAMINAZY AMP I JEGO ZNACZENIE METABOLICZNE

Niedobór deaminazy AMP (44) jest jedną z najczęstszych enzymopatii mięśniowych. Defekt ten, w postaci homo- lub heterozygotycznej, występuje u około 20% populacji ludzkiej (45-47). Wyróżniamy dwie zasadnicze postaci enzymopatii: pierwotną i wtórną (48). Postać wtórna niedoboru deaminazy AMP ma charakter niespecyficzny i jest następstwem uszkodzeń mięśni szkieletowych w przebiegu rozmaitych schorzeń układu mięśniowego i nerwowego. U osób z tymi schorzeniami, poza obniżeniem aktywności deaminazy AMP obserwuje się również obniżenie aktywności innych enzymów mięśniowych, takich jak: kinaza kreatyny i kinaza adenylanowa (48).

Postać pierwotna defektu dziedziczona jest w sposób autosomalny, recesywny i jest następstwem zmian w chromosomie 1 (1p13-p21), zawierającym gen kodujący izoformę mięśniową enzymu. Osoby dotknięte pierwotną postacią defektu uskarżają się czasami na powysiłkowe bóle mięśni (49). Zmiany genetyczne w tej postaci defektu są najczęściej wynikiem mutacji punktowych: C34T (Gln 12→Stop) w kodonie 12 eksonu 2, lub też C143T (Pro 48→Leu) w kodonie 48 eksonu 3 (45). Mutacja (C34T) tworząc kodon stop przedwcześnie kończy proces translacji i powoduje syntezę nieaktywnego enzymu (Rycina 2). Mutacja C143T doprowadza zaś do syntezy enzymu mało aktywnego i niestabilnego (49).

Oprócz najczęstszych mutacji opisanych powyżej, niekiedy zachodzi mutacja G468T (Gln 156→ His), powodująca w eksonie 5 zamianę obojętnej glutaminy, na zasadową histydynę. Mutacja ta dotyczy domeny funkcjonalnej izozymu mięśniowego AMPD i przez to destabilizuje jego konformację (50).

	Stop		Leu					
AAA	TAA	ATT....TGT	CTG	ATT....TTT	CAG	AGG		allel zmutowany
	↑		↑					
	C34T		C143T					
AAA	CAA	ATT....TGT	CCG	ATT....TTT	Gln156 CAG	AGG		allel niezmutowany
	Gln12		Pro48		↓			
					G468T			
AAA	CAA	ATT....TGT	CCG	ATT....TTT	CAT	AGG		allel zmutowany
					His			
	ekson 2		ekson 3		ekson 5			

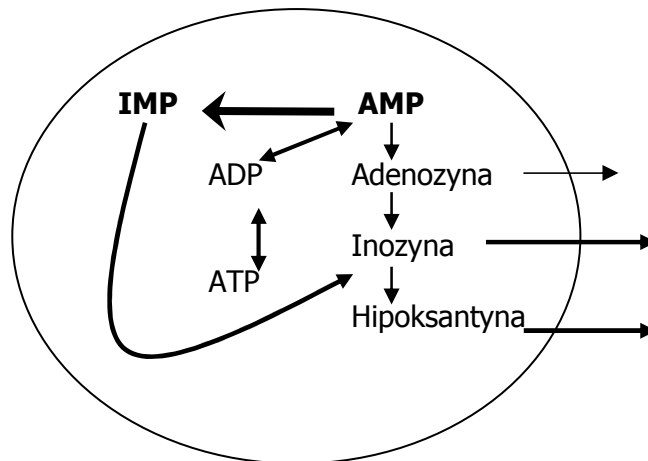
Rycina 2. Mutacje u pacjentów z niedoborem mięśniowej deaminazy AMP (AMPD1) (wg E. Rotzer, W. Mostier, H. Reichmann, Adv.Exp. Med. Biol., 1998 (49)).

Z przeprowadzonych w naszym laboratorium badań enzymu wyizolowanego z mięśnia udowego pacjentki z zupełnym (ponad 95 procentowym) niedoborem deaminazy AMP wynika, że niedobór ten dotyczył w głównej mierze formy enzymu eluowanej z fosfocelulozy 2,0 M roztworem chlorku potasu (51).

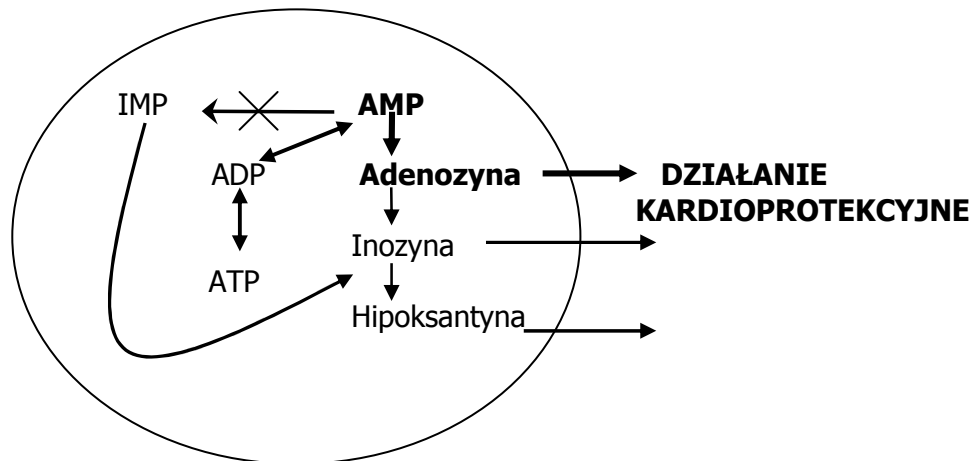
Powstający w reakcji deaminacji AMP amoniak buforując uwolnione podczas hydrolizy ATP jony wodoru przeciwdziała zakwaszeniu mięśnia. W mięśniu z niedoborem deaminazy AMP ilość wytwarzanego podczas skurczów mięśniowych amoniaku jest ograniczona, a to sprzyja zakwaszeniu mięśnia, zmniejsza jego wydolność energetyczną i powoduje łatwiejszą męczliwość (52,53). Patomechanizm łatwej męczliwości dotkniętych defektem osób potwierdzają zaobserwowane u nich znaczne, w porównaniu z osobami zdrowymi, obniżenie stężenia komórkowej fosfokreatyny przeliczone na jednostkę wykonanej pracy (20,29).

Innym, szczególnie ważnym dla metabolizmu serca, następstwem niedoboru mięśniowej deaminazy AMP jest wzrost komórkowych stężeń produktów degradacji puryn dyfundujących przez błonę komórkową, przede wszystkim adenozy (Rycina 3) (54). Adenoza jest farmakologicznie aktywnym metabolitem rozszerzającym naczynia wieńcowe i zwiększającym ukrwienie mięśnia sercowego. Niezależnie od tego, oddziałuje ona parakrynnie z receptorami A1 i A3 kardiomiocytów, co uruchamia kaskadę reakcji biochemicznych ochraniających („hartujących”) serce przed kolejnymi incydentami niedokrwiennymi (55).

Genotyp prawidłowy



Genotyp zmutowany



Rycina 3. Metaboliczne następstwa mutacji C34T genu *AMPD1* (wg. J.L. Swain, R.L. Sabina, E.W. Holmes, *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, 1985).

Podjęte niedawno przez grupę badaczy amerykańskich próby określenia roli predyspozycji genetycznych w etiologii, patogenezie i rokowaniu przebiegu kardiomiopatii rozstrzeniowej (choroby przebiegającej z ogólnym powiększeniem serca, jego przerostem i upośledzeniem kurczliwości (56)) doprowadziły nieoczekiwanie do wniosku, że mutacja C34T w genie *AMPD1* wydłuża znacząco przeżywalność osób z tym typem kardiomiopatii. Chorzy z niewydolnością serca typu rozstrzeniowego, wykazujący niedobór mięśniowej deaminazy AMP, doświadczali łagodniejszego przebiegu choroby, a czas ich przeżycia ulegał wyraźnemu wydłużeniu (54). Badania dalsze potwierdziły dobroczynne oddziaływanie wspomnianego defektu również u chorych z niewydolnością serca typu

zastoinowego (54), a także u chorych z chorobą wieńcową (57). Na mutację C34T w genie *AMPD1* natrafiano również sześciokrotnie częściej w grupie potencjalnych dawców do przeszczepu serca (58).

Kardioprotekcyjny skutek mutacji C34T genu *AMPD1* może mieć charakter wieloczynnikowy, lecz wydaje się być w głównej mierze powiązany z towarzyszącym tej mutacji wzrostem komórkowej produkcji adenozyiny. Wynikać on może zarówno ze wzmożonej produkcji ogólnej tego związku, przez dotknięte defektem mięśnie szkieletowe, jak i ze wzmożonej produkcji lokalnej, w samym sercu (54,59).

Niezależnie od adenozyiny, dobroczynne skutki mutacji genu *AMPD1* mogą być także następstwem wzrostu komórkowego stężenia samego AMP oraz efektów regulacyjnych, jakie związek ten wywiera na metabolizm serca poprzez AMP-zależną kinazę proteinową (60-62).

1.3. IZOFORMY DEAMINAZY AMP W MIOGENEZIE CZŁOWIEKA I SZCZURA

Prowadzone w latach siedemdziesiątych i osiemdziesiątych ubiegłego wieku badania na materiale zwierzęcym i ludzkim wykazały, że w trakcie rozwoju osobniczego w mięśniach szkieletowych ssaków aktywność deaminazy AMP wzrasta i że wzrostowi temu towarzyszą zmiany właściwości fizykochemicznych enzymu (np. termowrażliwość (63)), a także chromatograficznych i kinetyczno-regulacyjnych (64,65). Podjęte wówczas badania pozwoliły nie tylko ustalić skład izozymowy deaminazy AMP w tkankach i narządach szczura, ale także określić różnicowanie się tego składu w rozwoju osobniczym zwierzęcia (66). Obecnie wiadomo, że w miogenezie szczura występują trzy rozwojowe formy deaminazy AMP: embrionalna, płodowa oraz dojrzała. Forma embrionalna pojawia się w mięśniu szkieletowym szczura w pierwszym tygodniu życia płodowego i pozostaje tam obecna przez następny tydzień. Na tydzień przed porodem, w mięśniu szkieletowym szczura pojawia się forma płodowa. Pozostaje ona w tym mięśniu aż do pierwszego tygodnia życia pozapłodowego, po czym zostaje stopniowo zastępowana przez formę dojrzałą. W miarę dorastania zwierzęcia forma ta ulega dalszemu, subtelnemu różnicowaniu, wynikającemu z zachodzącej metabolicznej specjalizacji mięśni szkieletowych na „białe” i „czerwone” (67).

Informacje na temat różnicowania się składu izozymowego deaminazy AMP w przebiegu ontogenezy człowieka są niepełne. Wydaje się jednak, że obserwowany

u szczura schemat różnicowania się enzymu dotyczy również ontogenezy człowieka. Przeprowadzone w naszym laboratorium badania (64) wykazały że, uwolnienie z fosfocelulozy deaminazy AMP, wyekstrahowanej z mięśni szkieletowych 11 i 16 tygodniowego zarodka ludzkiego, wymaga wyższych, niż u człowieka dorosłego stężeń chlorku potasu. Poza różnicami chromatograficznymi, rozwojowe formy enzymu różniły się od jego formy dojrzałej także właściwościami kinetyczno-regulacyjnymi (65).

Rozwinięte w końcu ubiegłego wieku techniki biologii molekularnej pozwoliły zidentyfikować geny kodujące deaminazę AMP w tkankach szczura i człowieka, oraz określić ich posttranskrypcyjne i posttranslacyjne produkty. W wyniku przeprowadzonych wówczas badań ustalono, iż w odróżnieniu od form deaminazy AMP płodowej i dojrzałej, syntetyzowanych na bazie podobnej wielkości (około 2,5 kpz) i struktury transkryptów, forma embrionalna enzymu kodowana jest przez transkrypt, liczący około 3,4 kpz (68,69). Transkrypt ten, w porównaniu z transkryptami mniejszymi posiadał w obydwu fragmentach końcowych dłuższe sekwencje niekodujące (70). Jak wykazano później, wszystkie trzy omawiane transkrypty powstały w wyniku alternatywnego składania wspólnego transkryptu pierwotnego (71).

Szczegółowe badania peptydów wytworzonych w trakcie miogenezy szczura wykazały, że formy rozwojowe embrionalna i płodowa posiadają zbliżone masy „podjednostkowe” (78 kDa i 77,5 kDa) oraz taki sam punkt izoelektryczny ($pI \approx 6.2$). W odróżnieniu od nich masa „podjednostkowa” formy dojrzałej enzymu wynosiła około 80 kDa a jej punkt izoelektryczny $pI \approx 5,6$.

Wytworzone w czasie ontogenezy szczura peptydy były immunologicznie niejednorodne i nie reagowały wyłącznie z przeciwciałami dla nich specyficznymi. I tak na przykład forma płodowa o masie „podjednostkowej” 77,5 kDa reagowała z przeciwciałami specyficznymi dla izoformy wyizolowanej z mięśnia sercowego (C), podczas gdy dwa pozostałe peptydy reagowały z przeciwciałami specyficznymi dla izoformy B, obecnej w nerce (peptyd o masie 78 kDa), bądź też dla izoformy A, obecnej w mięśniu szkieletowym (peptyd o masie 80 kDa) (66).

W przeciwieństwie do izoform płodowej i dojrzałej, występujących wyłącznie w mięśniu szkieletowym, izoforma embrionalna deaminazy AMP poza mięśniem szkieletowym występowała również w innych tkankach i narządach szczura, takich jak: wątroba, płuca i śledziona (66).

Obecność w ontogenezie szczura trzech rozwojowych form ciężkiego łańcucha miozyny, podlegających ekspresji w tych samych co deaminaza AMP okresach rozwojowych, nasuwa przypuszczenie o istnieniu ogólnej, skoordynowanej ekspresji tych białek. Przypuszczenie to znajduje swe uzasadnienie w istniejących związkach strukturalnych, w obszarze prążka A włókienka mięśniowego deaminazy AMP z ciężkim łańcuchem miozyny (21,72-74).

O zmianach w składzie izozymowym enzymów mięśnia sercowego ssaków wiadomo niewiele. Badania autorów japońskich wykazały, że skład izozymowy enzymów mięśnia sercowego szczura, w tym deaminazy AMP, podlega zmianom już od pierwszego dnia życia pozapłodowego (75). I tak w ekstrakcie tkankowym serca noworodka szczura dało się wyróżnić trzy, chromatograficznie odmienne formy deaminazy AMP. W miarę dorastania zwierzęcia ich liczba zmniejszała się i w sercu szczura trzytygodniowego obecna była już tylko jedna izoforma. Właściwościami chromatograficznymi odpowiadała ona deaminazie AMP z serca szczura dorosłego (75).

2. CEL PRACY

Celem podjętych przeze mnie badań było zbadanie aktywności oraz niektórych właściwości fizykochemicznych deaminazy AMP mięśnia sercowego w trakcie rozwoju osobniczego człowieka.

3. MATERIAŁY I METODY

3.1. PREPARATYKA DEAMINAZY AMP

3.1.1. MATERIAŁ TKANKOWY

Mięsień sercowy osób zdrowych (dzieci oraz dorosłych), zmarłych śmiercią nagłą, pozyskiwano podczas autopsji przeprowadzanych (12-24 godzin po śmierci) w Zakładzie Medycyny Sądowej AMG. Mięsień sercowy płodów oraz noworodków pozyskiwano na Oddziałach Patologii Ciąży oraz Intensywnej Terapii Noworodków, II Kliniki Położnictwa i Ginekologii AMG. Pozyskane w czasie od 12-24 godzin po śmierci tkanki zamrażano (w temperaturze -24°C), po czym używano ich do celów preparatywnych.

3.1.2. OCZYSZCZANIE ENZYMU

3.1.2.1. PRZYGOTOWANIE FOSFOCELULOZY

Do fosfofelulozy P11 dodawano 0,5 M KOH, po 5 minutach płukano ją wodą destylowaną i odwirowywano, aż pH supernatantu było niższe niż 10. Potem w celu uwolnienia zawartego w złożu amoniaku, fosfofelulozę zalewano na 5 minut 0,5 M HCl, odwirowywano, po czym płukano wodą destylowaną, aż pH supernatantu było wyższe niż 3. Następnie do fosfofelulozy dodawano wersenian dwusodowy (1,86g/l), płukano wodą destylowaną oraz buforem ekstrakcyjnym Smiley'a (0,18 M KCl, 0,054 M KH_2PO_4 , 0,035 M K_2HPO_4 , 1 mM β -merkaptoetanol, pH 6,5), aż pH podłoża osiągnęło wartość 6,5, potrzebną do związania enzymu.

3.1.2.2. CHROMAOGRAFIA ENZYMU NA FOSFOCELULOZIE P11

Enzym oczyszczano według zmodyfikowanej (42) metody Sueltera i współpracowników (19). Zamrożone komory mięśnia sercowego (o łącznej wadze około 10 g) rozdrabniano, a następnie homogenizowano (3x przez 20 sekund) w trzykrotnej objętości buforu ekstrakcyjnego Smiley'a zawierającego dodatkowo inhibitor trypsyny (w stężeniu 1 $\mu\text{g/ml}$) oraz 1 mM fluorek fenylometylosulfonylu

(PMSF). Otrzymany homogenat mieszano przez 1 godzinę w temperaturze 4°C, po czym wirowano przez pół godziny przy 18000 x g i następnie przesączało przez potrójną warstwę gazy. Uzyskany supernatant mieszano przez 40 minut z 2,5 g uprzednio zrównoważonej fosfocelulozy, pozostawiając zawiesinę na noc w temperaturze 4°C. W dniu następnym zawiesinę mieszano przez 20 minut, po czym nanoszono na kolumnę szklaną o wymiarach 1,3 x 20 cm.

Zaadsorbowany enzym eluowano z kolumny, najpierw 15 ml 0,4 M KCl, potem 15 ml 0,75 M KCl, a następnie 32 ml chlorku potasu w 0,75-2 M gradiencie stężeń (16 ml 0,75 M, 16 ml 2 M), przy szybkości wypływu eluatu z kolumny około 7 ml/h.

3.2. POMIARY KINETYCZNO-REGULACYJNE DEAMINAZY AMP

3.2.1. OZNACZANIE AKTYWNOŚCI ENZYMATYCZNEJ

Aktywność enzymatyczną oznaczano metodą fenolowo-podchlorynową Chaney'a i Marbacha (76), opartą na kolorymetrycznej ocenie powstającego w trakcie reakcji barwnej indofenolu.

Mieszanina reakcyjna (o objętości końcowej 0,5 ml) zawierała: 0,05 M bufor bursztynianowy o pH 6,5 oraz 0,1 M roztwór substratu (5'AMP) odpowiednio w proporcjach 9:1. Po ustaleniu się temperatury (30°C), reakcję rozpoczynano dodaniem do mieszaniny inkubacyjnej 50 µl eluatu. Reakcję przerywano po upływie 15 minut dodając do mieszaniny reakcyjnej kolejno 1 ml odczynnika fenolowego (38,7 ml fenolu i 0,2 g nitroprusydku sodu w 2 litrach wodnego roztworu) i 1 ml odczynnika podchlorynowego (21 ml antyforminy i 20 g NaOH w 2 litrach wodnego roztworu). Następnie próbki inkubowano przez 50 minut w temperaturze 50°C, po czym w każdej z nich mierzono przy pomocy kolorymetru Epoll2 absorbancję w 620 nm.

Eluowane gradientem stężeń KCl frakcje o najwyższej aktywności specyficznej zlewano i używano do pomiarów kinetycznych. W używanych do pomiarów kinetycznych preparatach enzymatycznych nie wykazano aktywności deaminazy adenozyiny.

Wpływ pH na aktywność enzymu badano w przedziale pH 6,2-7,2. Próbki inkubacyjne o objętości końcowej 0,5 ml, zawierały 2,5 mM AMP oraz bufor

kakodylanowy o odpowiednim pH. Reakcję rozpoczynano dodaniem do mieszaniny inkubacyjnej roztworu enzymu zawierającego 2 μg białka. Aktywność enzymatyczną mierzono w sposób opisany powyżej.

3.2.2. OZNACZANIE STĘŻENIA BIAŁKA

Stężenie białka w próbkach oznaczano metodą Coomasie BG, używając roztworu wyjściowego o składzie: 0,33 g Coomasie BG (G 250), 66,67 ml 85% H_3PO_4 , 33,33 ml alkoholu etylowego. Roztwór roboczy (zawierający 3 ml roztworu wyjściowego, 8 ml 85% H_3PO_4 oraz 3,75 ml alkoholu etylowego) rozcieńczano wodą destylowaną do objętości końcowej 100 ml i następnie przesączało. Przygotowywane do oznaczeń próbki (zawierające 1 ml roztworu roboczego i 10 μl preparatu enzymatycznego) inkubowano w temperaturze pokojowej przez 10 minut, po czym mierzono ich absorbancję z wykorzystaniem kolorymetru Epoll2 w 578 nm.

3.2.3. OZNACZANIE PARAMETRÓW KINETYCZNYCH

Przygotowane do pomiarów kinetycznych mieszaniny inkubacyjne o objętości końcowej 0.5 ml zawierały: określone objętości 0.05 M buforu bursztynianowego o pH 6.5, substratu - 5'AMP (w stężeniach odpowiednio 0,8; 1,6; 3,2; 6,4; 9,6; 12,8; 25,6 i 51,2mM) oraz efektorów – ATP, ADP i ortofosforanu (odpowiednio w stężeniach 1 mM, 1 mM i 2,5 mM). Do tak przygotowanych mieszanin dodawano roztwór enzymu (zawierający około 2 μg białka) rozpoczynając pomiary aktywności. Próby ślepe zawierały rozpuszczone w buforze bursztynianowym najwyższe stężenia substratu, ewentualnie także efektor i/lub enzym.

Odczytywane ekstynkcje, pomniejszone o ekstynkcje prób ślepych, przeliczano na jednostki aktywności enzymatycznej, biorąc pod uwagę uprzednio wyznaczony współczynnik dla odczynnika fenolowego. Parametry kinetyczne reakcji (szybkość maksymalną reakcji - V_{max} , stałą półwysycenia enzymu substratem – $S_{0,5}$, oraz współczynnik kooperatywności - n_H) obliczano za pomocą programu SigmaPlot.

3.2.4. GENEROWANIE ZMIAN ŁADUNKU ENERGETYCZNEGO ADENYLANÓW

Ładunek energetyczny adenylianów generowano zgodnie z metodą opisaną przez Solano i Coffee (77).

Dla realizacji tego celu przygotowywano dwa zestawy próbek, z których pierwszy to próby ślepe - nie zawierające enzymu. W zestawie drugim wyjściowe roztwory AMP i ATP (2,5 mM w buforze bursztynianowym o pH 6,5), o objętości końcowej 1 ml mieszano wzajemnie w zmieniających się proporcjach (rozpoczynając od 10 części ATP, poprzez 9 części ATP / 1 część AMP aż do 1 części ATP / 9 części AMP i w końcu 10 części AMP), po czym do każdej z prób dodawano 0,1 μ l 5 M $MgCl_2$ oraz 0,1 μ g miokinazy. W celu osiągnięcia równowagi stężeń ATP, ADP i AMP przygotowane w powyższy sposób mieszaniny inkubowano przez 2 godziny w temperaturze 30°C. Następnie do każdej z nich dodawano 50 μ l roztworu (zawierającego około 2 μ g białka) enzymu rozpoczynając pomiar aktywności enzymatycznej.

3.3. ELEKTROFOREZA ENZYMU W ŻELU POLIAKRYLAMIDOWYM W WARUNKACH DENATURUJĄCYCH (SDS-PAGE)

3.3.1 ROZDZIAŁ ELEKTROFORETYCZNY ENZYMU

Rozdziały elektroforetyczne enzymu prowadzono w aparacie Hoefer SE250 z zastosowaniem żelu nieciągłego, składającego się z 5% żelu górnego i 10% żelu dolnego. Żel dolny zawierał: 5,9 ml H_2O , 5 ml 30% roztworu akrylamidów (29,2 g akrylamidu, 0,8 g NN'-metylenobisakrylamidu w 100 ml H_2O), 3,8 ml 1,5 M Tris o pH 8,8, 150 μ l 10% SDS, 150 μ l 10% APS (nadsiaroczan amonu) oraz 6 μ l TEMED (NNN'-tetraetyloetylenodiamina). Dla przyspieszenia procesu polimeryzacji wylany żel nawarstwiano wodą, którą po spolimeryzowaniu żelu usuwano. Płytki ze spolimeryzowanym żelem dolnym umieszczano w aparacie do elektroforezy, po czym wylewano na niego żel górny o składzie: 2,7 ml H_2O , 670 ml 30% roztworu akrylamidów, 500 μ l 0,5 M TRIS pH 6,8, 40 μ l 10% SDS, 40 μ l 10% APS, 4 μ l TEMED, następnie nakładano potrzebny dla wytworzenia studzienek grzebień. Po spolimeryzowaniu żelu i usunięciu grzebienia, płytki z żelem zalewano buforem elektrodowym o pH 8,3 (25 mM Tris, 192 mM glicyna, 0.1% SDS) rozpoczynając

elektroforezę. Elektroforezę prowadzono przez 105 minut, stosując przez 30 minut prąd o napięciu 100V, a następnie przez 75 minut prąd o napięciu 120V.

3.3.2 BARWIENIE BIAŁEK W ŻELU POLIAKRYLAMIDOWYM BARWNIKIEM FAST COOMASIE

Po zakończonej elektroforezie i usunięciu żelu górnego, dla utrwalenia żelu dolnego wytrząsano go przez około 20 minut w roztworze Fast Coomasie (8% Fast Coomasie, 50% alkohol metylowy, 10% lodowaty kwas octowy) w temperaturze pokojowej.

W celu odbarwienia utrwalonego żelu wytrząsano go przez 30 minut w roztworze odbarwiającym (5% alkohol metylowy, 1% lodowaty kwas octowy), po czym przepłukiwano wodą destylowaną, suszono i archiwizowano.

3.4. IDENTYFIKACJA ENZYMU METODĄ WESTERN BLOTTING

3.4.1. PRZYGOTOWANIE PRÓBEK

Ważące 0,1 g fragmenty tkanki umieszczano w 1 ml buforu ekstrakcyjnego z dodatkiem 10 μ l koktajlu inhibitorów proteaz (104 mM AEBSF, 70 μ M aprotynina, 2 mM leupeptyna, 4 mM bestatyna, 1,5 mM pepstatyna A, 1,4 mM E-64), po czym homogenizowano w ręcznym homogenizatorze szklano-teflonowym, odwirowywano (20 minut w 3000 x g), a następnie w otrzymanym supernatancie oznaczano stężenie białka. Próby zawierające po 10 μ g białka zawieszano w buforze lizującym (4% SDS, 20% glicerol, 10% β -merkaptioetanol, 0,125 M Tris-HCl o pH 6,8, 0,04% błękit bromofenolowy) w proporcji 1:1, inkubowano przez 5 minut we wrzącej łaźni wodnej, odwirowywano przez 1 minutę przy 3000 x g, po czym наносzono na żel i rozpoczynano elektroforezę.

3.4.2. TRANSFER BIAŁEK Z ŻELU NA MEMBRANĘ

Membranę PVDF (Millipore Immobilon-P, 0,45 μ m, typ filtru PVDF) przycinano do rozmiarów żelu dolnego, po czym zanurzano w alkoholu metylowym i moczo 5 minut w wodzie destylowanej. Po przeprowadzeniu rozdziału

elektroforetycznego i usunięciu żelu górnego, żel dolny umieszczano w ramce aparatu do transferu i zanurzano w schłodzonym buforze do transferu (25 mM Tris, 190 mM glicyna, pH 8,3) układając „kanapkę” złożoną z gąbki, papieru filtracyjnego (mini trans-blot firmy BIO-RAD), membrany PVDF, żelu poliakrylamidowego oraz papieru filtracyjnego.

Następnie ramkę przekładano do wypełnionego schłodzonym buforem do transferu aparatu do elektrotransferu (firmy BIO-RAD), rozpoczynając elektrotransfer. Elektrotransfer prowadzono 16 godzin, stosując prąd o napięciu 20 V i natężeniu 400 mA.

3.4.3. WESTERN BLOTTING

Po zakończeniu elektrotransferu, w celu zablokowania miejsc wiążących niespecyficznie białko, membranę inkubowano przez 1 godzinę w 100 ml 5% roztworu mleka w buforze PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 6,5 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, pH 7,2). Tak przygotowaną membranę inkubowano przez 24 godziny, w temperaturze 4°C, w 10 ml 5% roztworu mleka w PBS z dodatkiem (rozcieńczonych w stosunku 1:2500) przeciwciał poliklonalnych (otrzymanych od dr R. Sabina z Medical College of Wisconsin, USA), skierowanych przeciwko rekombinowanej izoformie mięśniowej deaminazy AMP człowieka. Dla usunięcia niezwiązanych przeciwciał, membranę przepłukiwano trzykrotnie przez 10 minut w 100 ml PBS, po czym inkubowano przez 1 godzinę w 5% roztworze mleka w PBS z dodatkiem przeciwciał (rozcieńczonych w stosunku 1:2000) sprzężonych z alkaliczną fosfatazą, skierowanych przeciwko IgG króliczym. Tak przygotowaną membranę płukano trzykrotnie przez 10 minut w roztworze PBS, po czym inkubowano przez 5 minut w buforze APB (0,1 M Tris-HCl o pH 9,5, 0,1 M NaCl). Immunodetekcję prowadzono w obecności rozcieńzonego (w stosunku 1:100) substratu chemiluminescencyjnego (25 mM CDP-Star). Po zakończeniu immunodetekcji membranę zawijano w przezroczystą folię i eksponowano 15 minut wobec kliszy XAR-5 Kodak.

Dla identyfikacji pozostałych izoform (wątrobowej i erytrocytarnej) deaminazy AMP człowieka, zaadsorbowane na membranie przeciwciała przeciwko izoformie mięśniowej zrywano, inkubując membranę przez 30 minut w temperaturze 50°C w roztworze zawierającym 100 mM β-merkaptotanol, 2% SDS i 62,5 mM Tris-

HCl o pH 6,7. Następnie membranę płukano dwukrotnie przez 10 minut roztworem PBS, po czym przez 30 minut w 5% roztworze mleka w PBS.

Tak przygotowaną membranę inkubowano kolejno z przeciwciałami skierowanymi przeciwko rekombinowanym izoformom AMPD2 i AMPD3, powtarzając opisaną już procedurę od etapu inkubacji membrany z właściwym rodzajem przeciwciał. Na koniec, dla oszacowania ilości naniesionych ekstraktów, membranę inkubowano w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę z przeciwciałami (rozcieńczonymi w stosunku 1:250) skierowanymi przeciwko aktynie.

3.5. ANALIZA GENOTYPU *AMPD1*

Analizę genotypu AMPD1 przeprowadzono w Heart Science Centre, Imperial College, Harefield Hospital, Anglia. Dla wykazania mutacji C34T w genie *AMPD1* wykorzystywano DNA wyizolowany z mięśnia sercowego. Startery dla amplifikacji (metoda PCR) eksonu 2, zaprojektowano w oparciu o sekwencję genomową AMPD1 (GI:886260). Amplifikację docelowego DNA przeprowadzano (w warunkach zalecanych przez producenta) przy użyciu polimerazy HotStar Taq (1.5U). Obecność mutacji C34T w amplifikowanym DNA potwierdzano za pomocą analizy SSCP (single stranded conformational polymorphism) oraz metody RFLP (restriction fragment length polymorphism).

3.6. ODCZYNNIKI I INNE MATERIAŁY

Sigma-Aldrich Co

Akrylamidy, 5'-AMP, ATP, β -merkaptoetanol, błony fotograficzne KODAK XAR-5, Immobilon P, glicyna, kolumny chromatograficzne do rozdzielania białek, mieszanina inhibitorów proteaz, miokinaza, przeciwciała królicze anty-aktyna, przeciwciała kozie anty-królicze, SDS, Tris.

Medical College of Wisconsin, USA

Przeciwciała poliklonalne skierowane przeciwko rekombinowanej izoformie mięśniowej, wątrobowej i erytrocytarnej deaminazy AMP człowieka.

P PARK SCIENTIFIC LIMITED Northampton, U.K.

Fosfoceluloza P-11

SERVA

Coomasie Brilliant Blue G-250

BIO-RAD

APS, papier filtracyjny mini trans-blot, TEMED

Polskie Odczynniki Chemiczne

96% alkohol etylowy, alkohol metylowy, fenol, HCl, H₂SO₄, H₃PO₄, KCl, KOH, KH₂PO₄, NaCl, NaOH, Na₂HPO₄, MgCl₂, kwas octowy lodowaty

Boehringer Mangleim GmbH

PMSF, inhibitor trypsyny

Roche Diagnostics GmbH

substrat CDP-Star

4. WYNIKI

4.1. WŁAŚCIWOŚCI CHROMATOGRAFICZNE ENZYMU

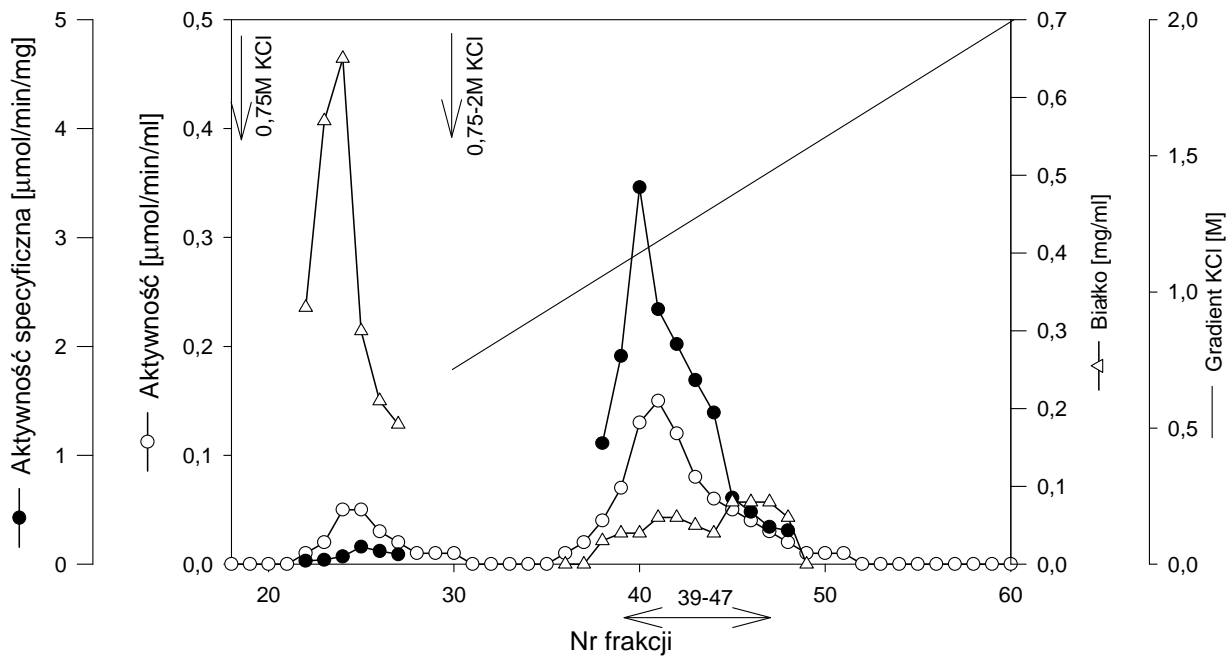
Enzym izolowano z komórek serc ludzkich pobranych w okresach: płodowym, noworodkowym, dziecięcym i dojrzałym rozwoju osobniczego. Tabela I przedstawia średnie aktywności deaminazy AMP w homogenatach serc ludzkich we wspomnianych okresach ontogenezy.

Tabela I

Aktywność deaminazy AMP w homogenatach serc ludzkich.

Okres rozwoju osobniczego	Aktywność specyficzna deaminazy AMP w homogenacie serca ludzkiego [$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$]
płodowy	0,07 (\pm 0,03)
noworodkowy	0,09 (\pm 0,03)
dziecięcy	0,07 (\pm 0,01)
dojrzały	0,07 (\pm 0,01)

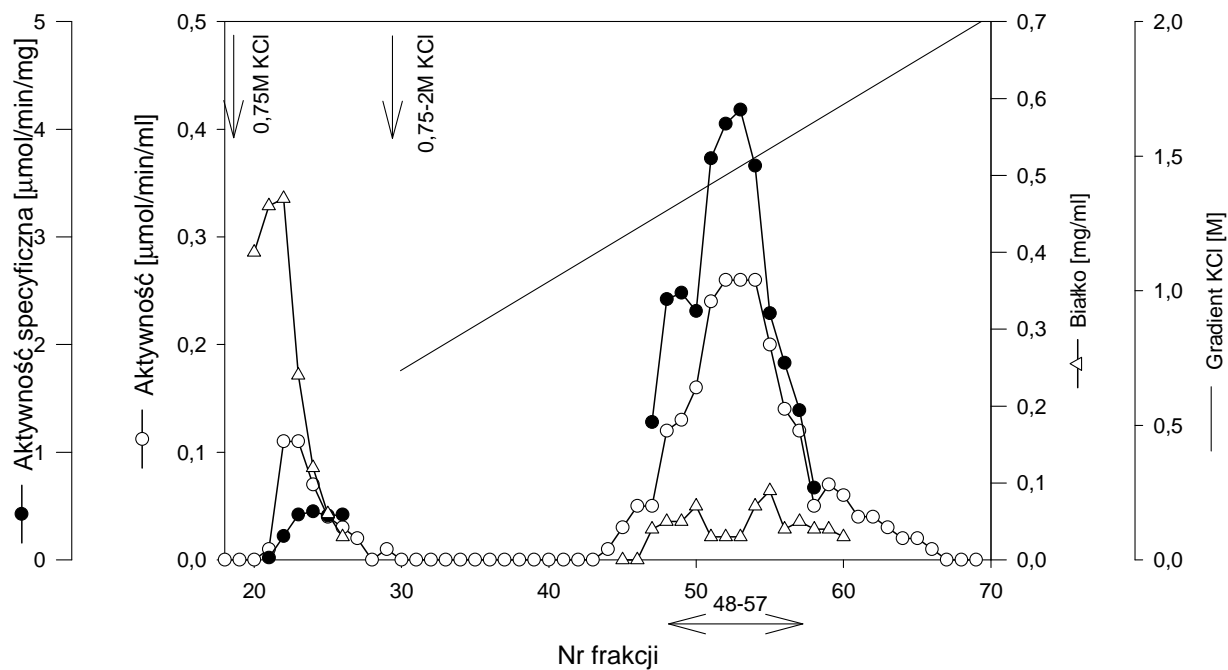
Ryciny 1-4 przedstawiają rozdziały chromatograficzne deaminazy AMP serca ludzkiego w badanych okresach ontogenezy. Jak wynika z przedstawionych rycin rozdziały chromatograficzne enzymu w poszczególnych etapach ontogenezy przebiegały podobnie, pozwalając wyróżnić w każdym z nich dwa, oddzielone od siebie szczyty aktywności: jeden wypłukiwany 0,75 M chlorkiem potasu - reprezentujący enzym mało aktywny, częściowo zdegradowany oraz drugi, wypłukiwany 1,2 – 1,5 M gradientem chlorku potasu - reprezentujący bardziej aktywny enzym w dużym stopniu oczyszczony, niezdegradowany lub zdegradowany przez enzymy proteolityczne w stopniu nieznacznym.



Rycina 1.

Deaminaza AMP serca ludzkiego (serce płodu) – chromatografia na kolumnie z fosfocelulozą.

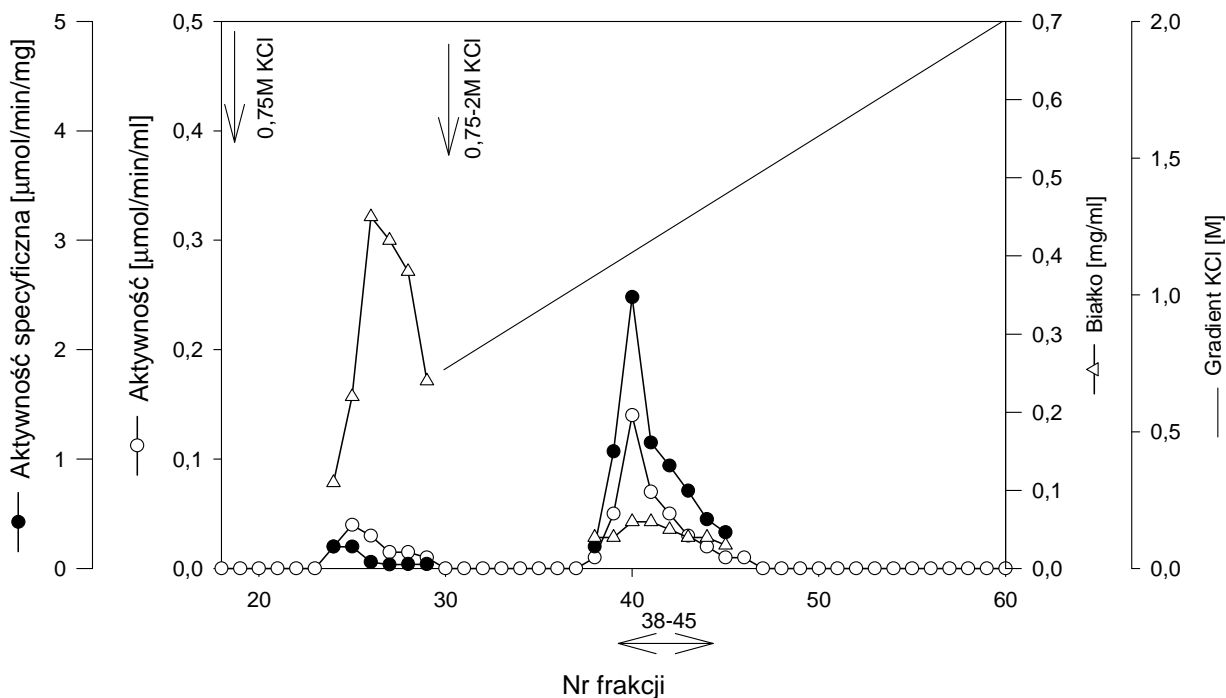
Objętość zbieranych frakcji $\approx 1,2$ ml.



Rycina 2.

Deaminaza AMP serca ludzkiego (serce noworodka) - chromatografia na kolumnie z fosfocelulozą.

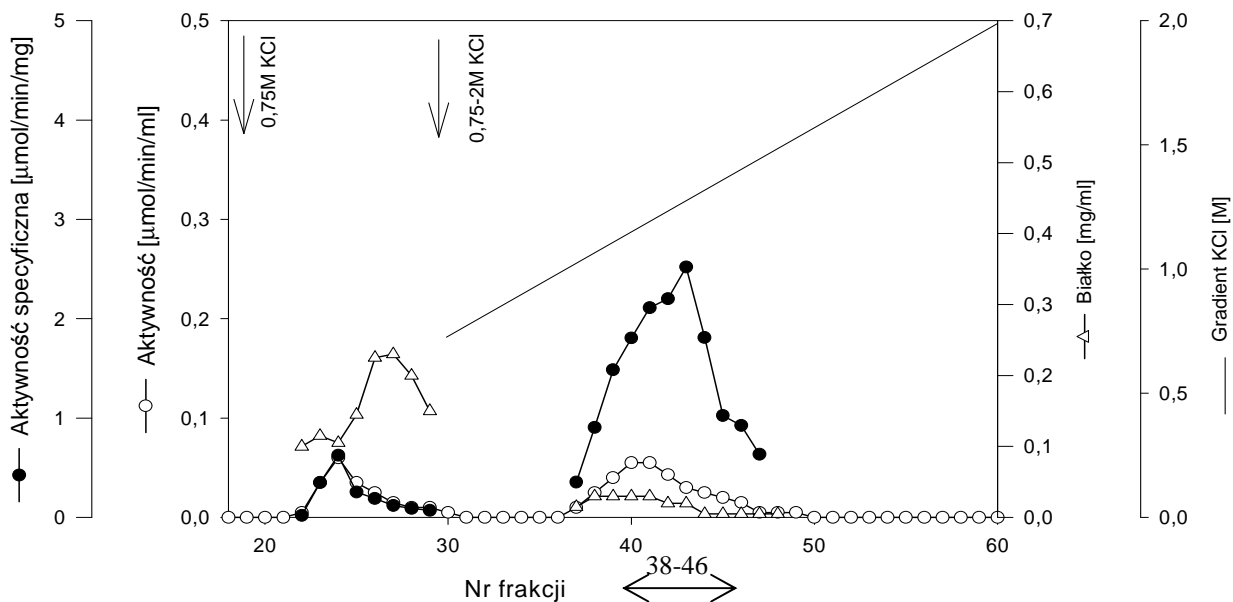
Objętość zbieranych frakcji $\approx 1,2$ ml.



Rycina 3.

Deaminaza AMP serca ludzkiego (serce dziecka) - chromatografia na kolumnie z fosfocelulozą.

Objętość zbieranych frakcji $\approx 1,2$ ml.



Rycina 4.

Deaminaza AMP serca ludzkiego (serce człowieka dorosłego) - chromatografia na kolumnie z fosfocelulozą.

Objętość zbieranych frakcji $\approx 1,2$ ml.

W wyniku przeprowadzonej chromatografii na fosfocelulozie oczyszczono enzym blisko dwudziestokrotnie uzyskując preparaty enzymatyczne o aktywnościach specyficznych przedstawionych w Tabeli II.

Tabela II

Aktywności preparatów enzymatycznych uzyskanych po chromatografii na fosfocelulozie.

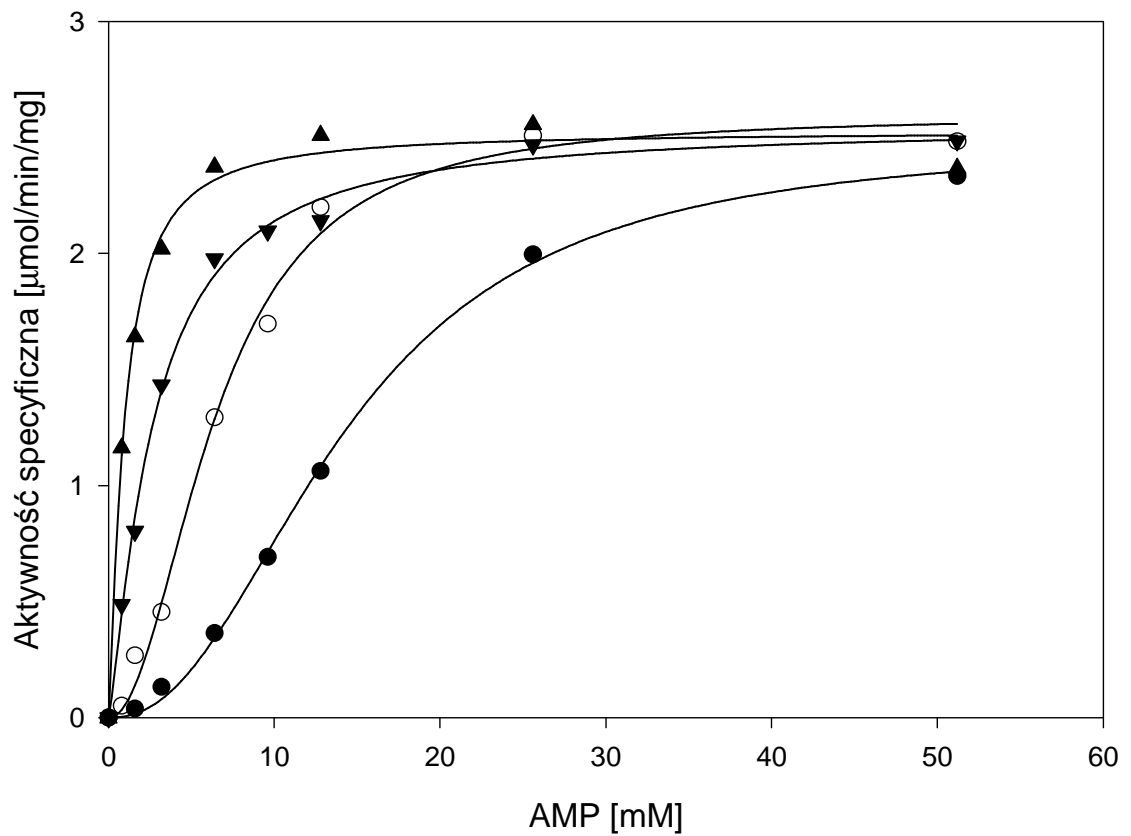
Okres rozwoju osobniczego	Aktywność specyficzna deaminazy AMP [$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$]
płodowy	1,4 (\pm 0,1)
noworodkowy	2,5 (\pm 0,1)
dziecięcy	1,4 (\pm 0,2)
dojrzały	0,9 (\pm 0,1)

4.2. WŁAŚCIWOŚCI KINETYCZNO – REGULACYJNE IZOLOWANEGO ENZYMU

4.2.1. KINETYKA WYSYCENIA ENZYMU SUBSTRATEM

Ryciny 5 - 8 ilustrują właściwości kinetyczno–regulacyjne deaminazy AMP serca ludzkiego w różnych okresach rozwoju osobniczego.

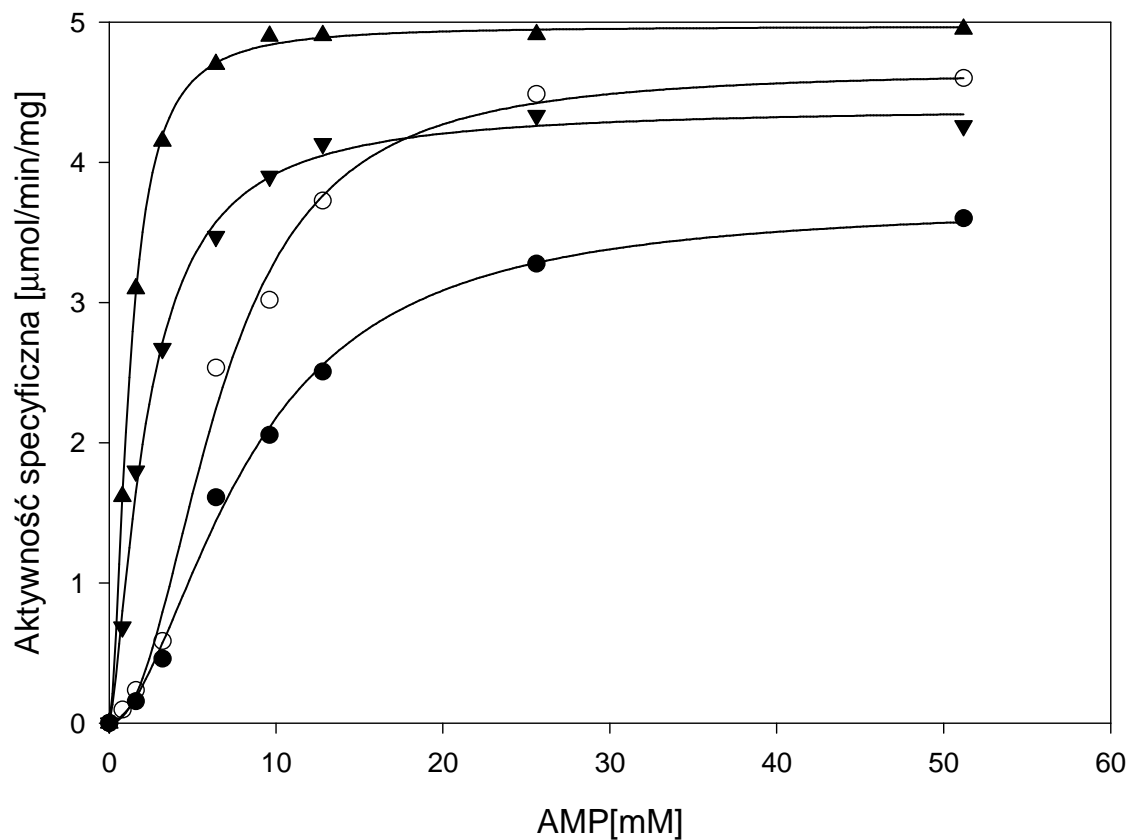
Jak wynika z przedstawionych poniżej rycin, mierzona w warunkach kontrolnych (w nieobecności efektorów allosterycznych) sigmoidalna kinetyka wysycenia enzymu substratem charakteryzowała enzym, w każdym z badanych okresów ontogenezy.



Rycina 5.

Deaminaza AMP serca ludzkiego (serce płodu) - kinetyka wysycenia enzymu substratem.

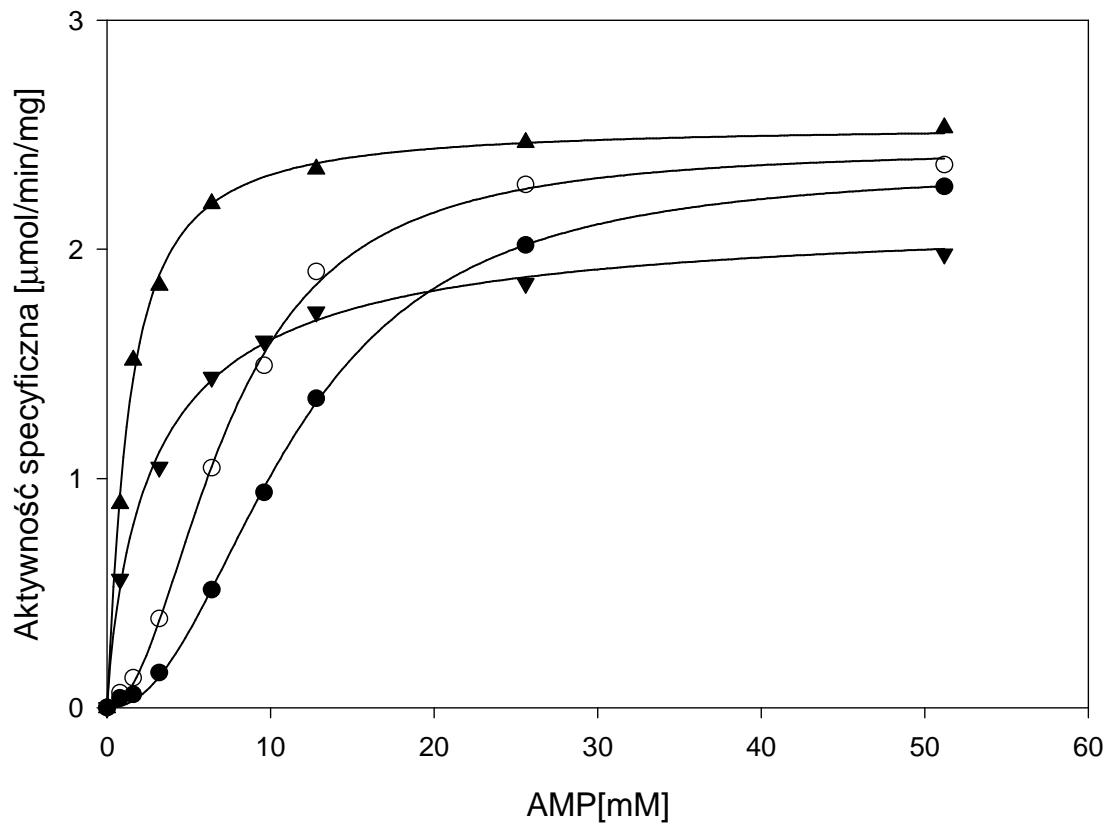
Oznakowanie krzywych kinetycznych: ○ brak efektora (warunki kontrolne),
 ▲ obecność 1 mM ATP, ▼ obecność 1 mM ADP, ● obecność 2,5 mM Pi.



Rycina 6.

Deaminaza AMP serca ludzkiego (serce noworodka) - kinetyka wysycenia enzymu substratem.

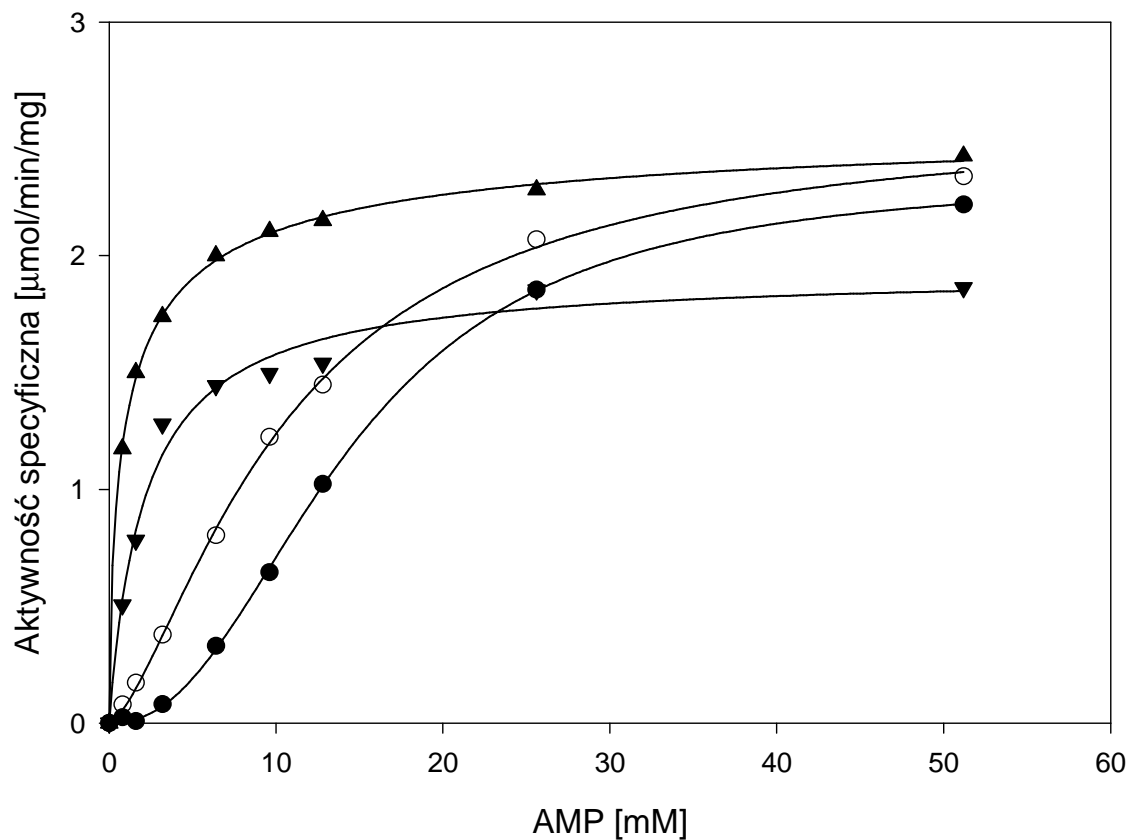
Oznakowanie krzywych kinetycznych: ○ brak efektora (warunki kontrolne),
 ▲ obecność 1 mM ATP, ▼ obecność 1 mM ADP, ● obecność 2,5 mM Pi.



Rycina 7.

Deaminaza AMP serca ludzkiego (serce dziecka) - kinetyka wysycenia enzymu substratem.

Oznakowanie krzywych kinetycznych: ○ brak efektora (warunki kontrolne),
 ▲ obecność 1 mM ATP, ▼ obecność 1 mM ADP, ● obecność 2,5 mM Pi.



Rycina 8.

Deaminaza AMP serca ludzkiego (serce człowieka dorosłego) - kinetyka wysycenia enzymu substratem.

Oznakowanie krzywych kinetycznych: ○ brak efektora (warunki kontrolne),
 ▲ obecność 1 mM ATP, ▼ obecność 1 mM ADP, ● obecność 2,5 mM Pi.

Tabela III przedstawia wartości parametrów kinetycznych reakcji katalizowanej przez deaminazę AMP serca ludzkiego, w badanych okresach rozwoju osobniczego, mierzone w nieobecności i w obecności najważniejszych efektorów allosterycznych enzymu.

Jak wynika z Tabeli III, w nieobecności efektorów allosterycznych wartości stałej półwysycenia ($S_{0.5}$) dla enzymu wyizolowanego z serca płodu, noworodka oraz dziecka były niższe od wartości tej stałej wyznaczonej dla enzymu wyizolowanego z serca człowieka dorosłego. Obecność efektorów allosterycznych (ATP, ADP, ortofosforan) modyfikowała wyraźnie wartości stałej półwysycenia, wpływając tylko nieznacznie na szybkość maksymalną reakcji. Szybkość maksymalna reakcji katalizowanej przez deaminazę AMP wyizolowaną z serca noworodka znacząco przewyższała, w każdych warunkach, wartości tego parametru wyznaczone dla enzymu wyizolowanego z serca ludzkiego w pozostałych okresach rozwoju osobniczego.

Tabela III.

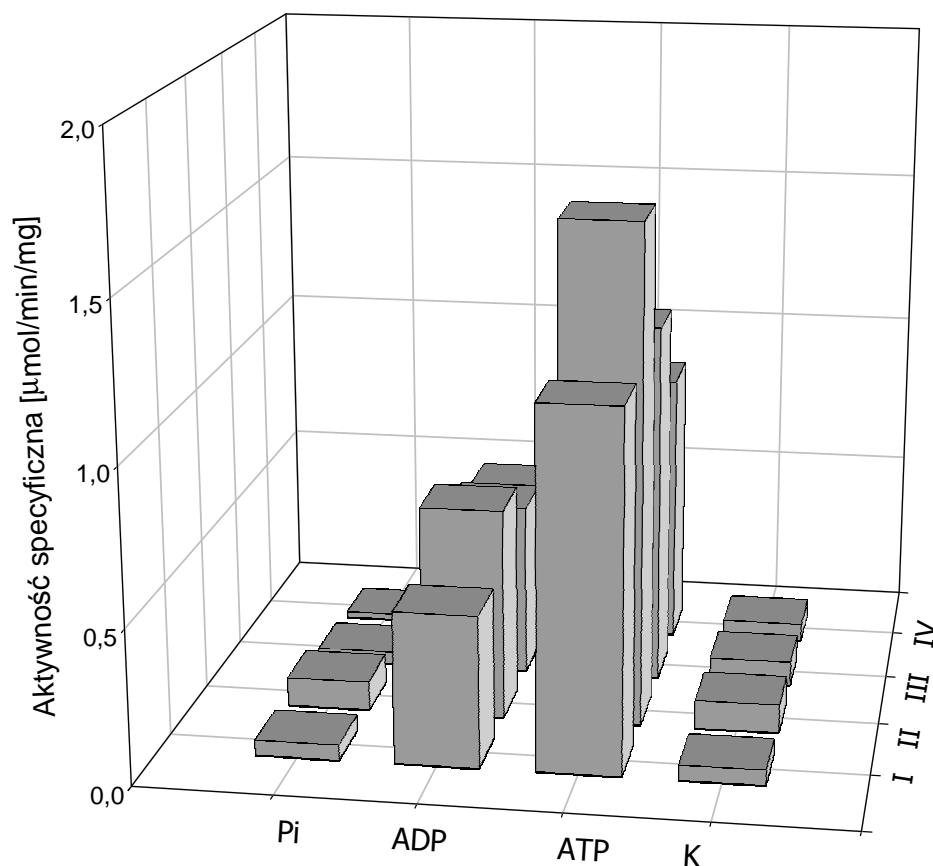
Deaminaza AMP serca ludzkiego - wpływ efektorów allosterycznych na wartości liczbowe parametrów kinetycznych reakcji w różnych okresach rozwoju osobniczego człowieka.

Grupa wiekowa Dodany efektor	$S_{0.5}$ (mM)				V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min}$)				n_H			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV
Brak efektora (kontrola)	6,5	6,6	7,3	9,6	2,6	4,6	2,4	2,5	2,1	2,2	2,3	1,5
ATP	0,9	1,2	1,3	1,0	2,5	4,9	2,5	2,5	1,1	1,0	1,2	0,9
ADP	2,7	2,3	3,0	2,2	2,6	4,4	2,2	2,0	1,3	1,4	1,0	1,1
Pi (ortofosforan)	14,3	8,2	11,4	12,2	2,5	3,7	2,3	2,4	2,2	1,8	2,2	1,9

I - enzym wyizolowany z serca płodu, II - enzym wyizolowany z serca noworodka, III - enzym wyizolowany z serca dziecka, IV - enzym wyizolowany z serca dorosłego człowieka.

Wartości S.D. nie przekraczały 10% wartości wyliczonych średnich.

Rycina 9 przedstawia regulacyjny wpływ efektorów allosterycznych na aktywność deaminazy AMP serca ludzkiego, mierzony w 0,8 mM stężeniu substratu.



Rycina 9.

Deaminaza AMP serca ludzkiego – regulacyjny wpływ efektorów allosterycznych na aktywność enzymu w różnych okresach ontogenezy.

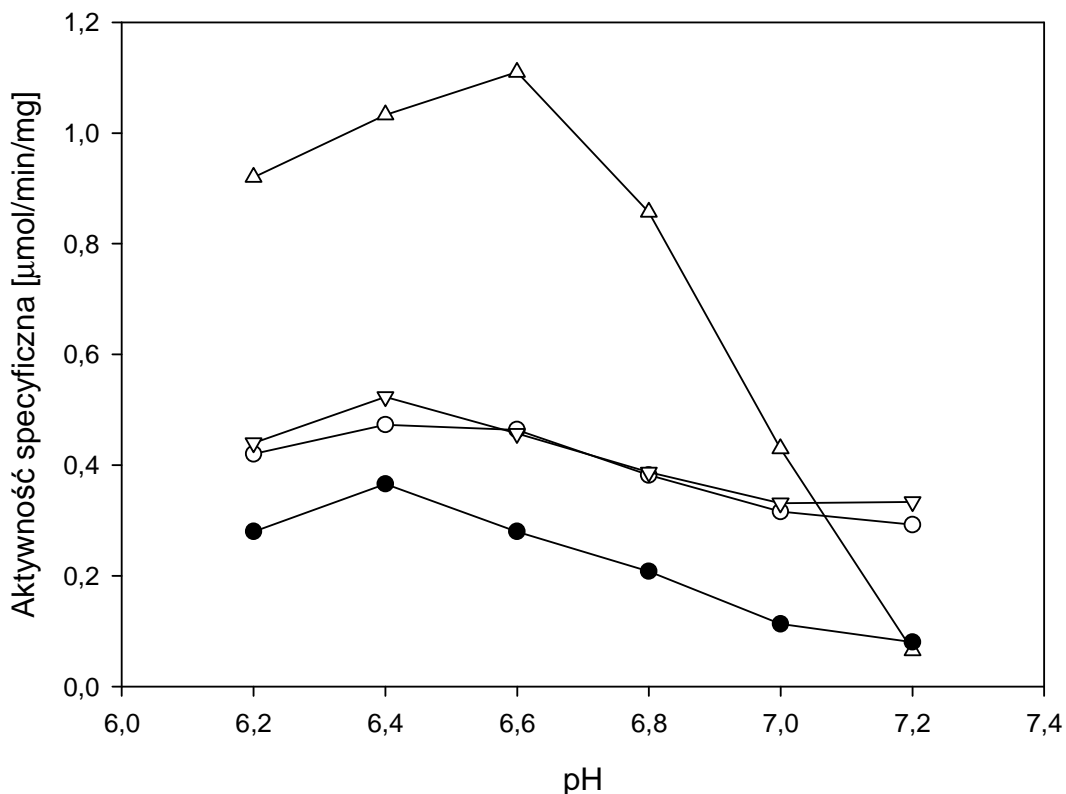
Enzym wyizolowany z serca: I – płodu, II – noworodka, III – dziecka, IV - człowieka dorosłego. K – reakcja enzymu w nieobecności efektorów (warunki kontrolne).

Aktywność enzymu mierzono w 0,8 mM stężeniu substratu.

Jak wynika z ryciny 9 w badanym stężeniu substratu uwidocznili się silny aktywujący wpływ ATP oraz stosunkowo niewielki, słabo widoczny hamujący wpływ ortofosforanu. Aktywujący wpływ ATP (szczególnie wyraźny w okresie płodowym, noworodkowym i dziecięcym) w okresie dojrzałym rozwoju osobniczego uległ wyraźnemu osłabieniu.

4.2.2. WPŁYW ZMIAN STĘŻENIA JONÓW WODOROWYCH (pH)

Rycina 10 przedstawia wpływ zmian pH na aktywność deaminazy AMP serca ludzkiego w badanych okresach rozwoju osobniczego.



Rycina 10.

Deaminaza AMP serca ludzkiego - wpływ zmian stężenia jonów wodorowych na aktywność enzymu.

Enzym wyizolowany z serca: płodu ○ , noworodka △ , dziecka ▽ , człowieka dorosłego ● .

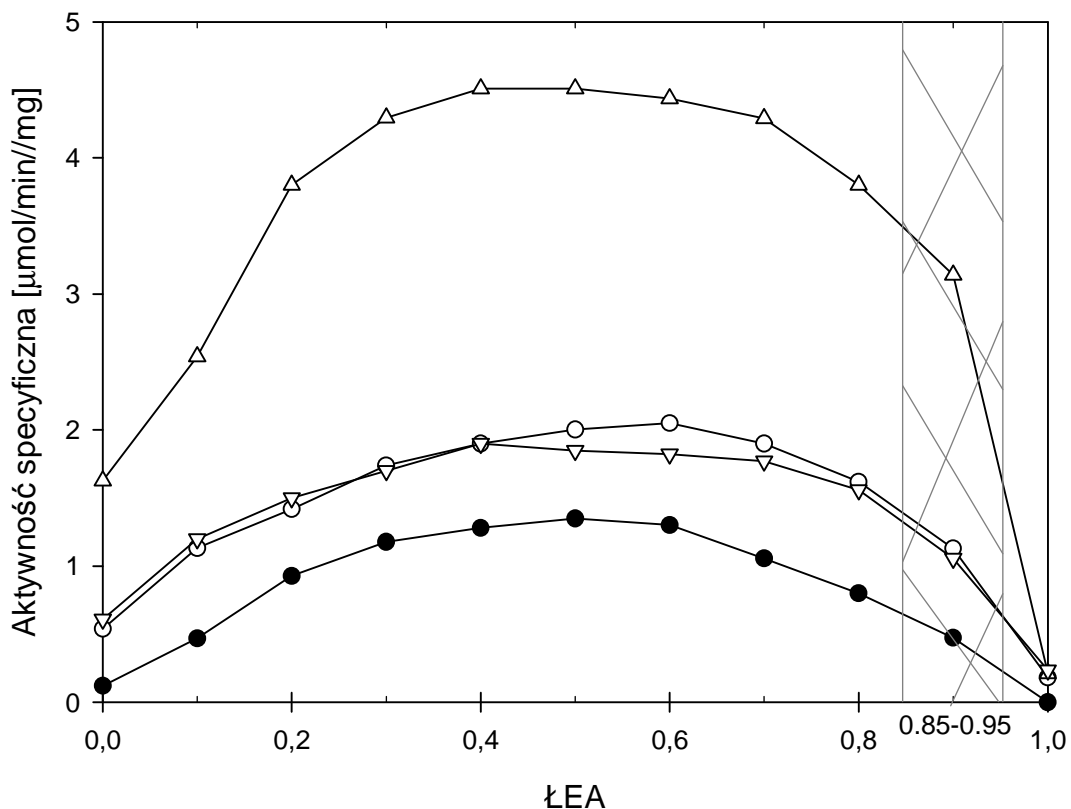
Aktywność enzymu mierzono w 0,1 M buforze kakodylanowym przy 2,5 mM stężeniu substratu.

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

Jak wynika z powyższej ryciny optimum aktywności enzymu wyizolowanego z serca płodu, dziecka oraz człowieka dorosłego przypadło na pH 6,4. W przeciwieństwie do tego enzym wyizolowany z serca noworodka optimum aktywności wykazywał w pH 6,6. W pH wyższych od optymalnego, aktywność enzymu wyizolowanego z serca noworodka gwałtownie malała, osiągając wartości niższe od obserwowanych w okresie płodowym i dziecięcym.

4.2.3. WPŁYW ZMIAN WARTOŚCI ŁADUNKU ENERGETYCZNEGO ADENYLANÓW (ŁEA)

Rycina 11 przedstawia wpływ zmian wartości ładunku energetycznego adenylanów (ŁEA) na aktywność deaminazy AMP serca ludzkiego w badanych etapach rozwoju osobniczego.



Rycina 11.

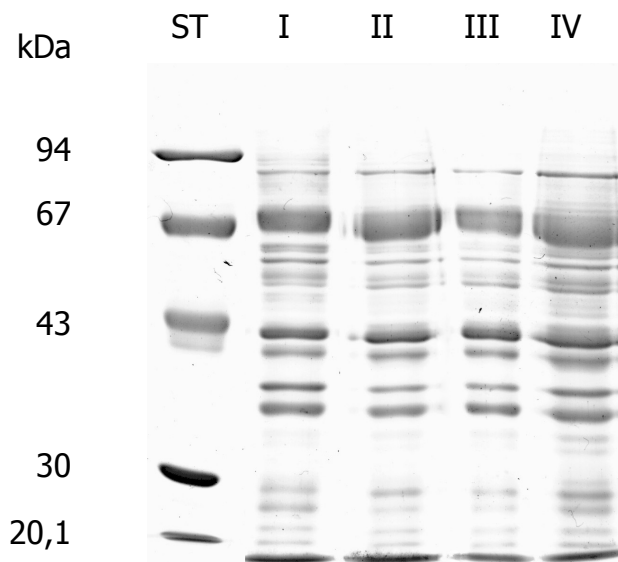
Deaminaza AMP serca ludzkiego - wpływ zmian wartości ładunku energetycznego adenylanów (ŁEA) na aktywność enzymu.

Enzym wyizolowany z serca: płodu ○ , noworodka Δ , dziecka ▽ , człowieka dorosłego ● .

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

Jak wynika z przedstawionej powyżej ryciny, w przedziale fizjologicznych zmian ŁEA (0,85 – 0,95), aktywność deaminazy AMP wyizolowanej z serca noworodka zmieniała się gwałtowniej niż zaobserwowano to w pozostałych okresach rozwoju osobniczego.

4.3. SKŁAD PODJEDNOSTKOWY I ODPOWIEDŹ IMMUNOLOGICZNA ENZYMU



Rycina 12.

Deaminaza AMP serca ludzkiego - elektroforeza homogenatów mięśnia sercowego w badanych okresach rozwoju osobniczego.

Oznaczenia ścieżek:

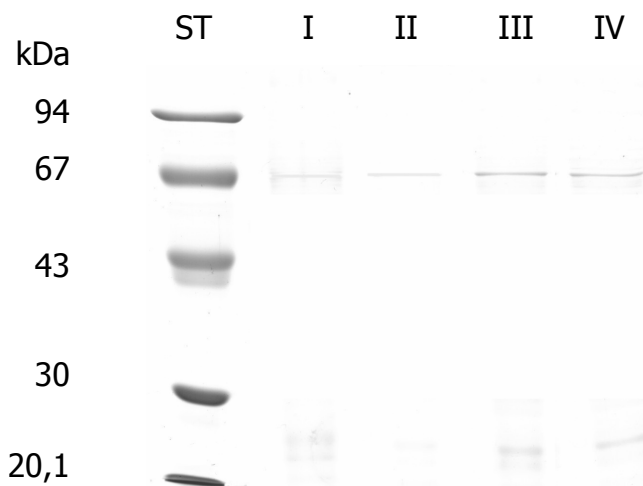
ST – wzorce masowe (94 kDa fosforylaza b, 67 kDa albumina, 43 kDa ovalbumina, 30 kDa anhydraza węglanowa, 20,1 kDa inhibitor trypsyny),

I – homogenat serca płodu, II – homogenat serca noworodka, III – homogenat serca dziecka, IV - homogenat serca dorosłego człowieka.

Na żel naniesiono po 10µg białka.

Jak pokazano na rycinie 12 rozdziały elektroforetyczne homogenatów serca ludzkiego w badanych okresach rozwoju osobniczego miały podobny wygląd.

Nie wykazywały różnic także rozdziały elektroforetyczne preparatów enzymatycznych uzyskanych w wyniku chromatografii na fosfocelulozie (Ryc. 13). W każdym z nich uwidoczniła się obecność białka o masie cząsteczkowej około 68 kDa. Białku temu towarzyszyły inne białka, o niższych masach cząsteczkowych, będące śladami zanieczyszczenia lub/i produktami częściowej degradacji białka o największej masie cząsteczkowej.



Rycina 13.

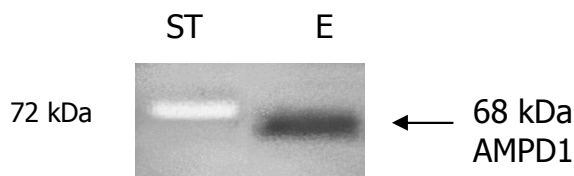
Deaminaza AMP serca ludzkiego - rozdział elektroforetyczny preparatów enzymatycznych w badanych okresach ontogenezy.

Oznaczenia ścieżek:

ST - standardy (94 kDa fosforylaza b, 67 kDa albumina, 43 kDa ovalbumina, 30 kDa anhydraza węglanowa, 20,1 kDa inhibitor trypsyny), I – enzym z serca płodu, II – enzym z serca noworodka, III – enzym z serca dziecka, IV - enzym z serca człowieka dorosłego.

Na żel naniesiono po 5 μ g białka.

Rycina 14 przedstawia analizę Western blotting uwidocznionych na poprzedniej rycinie białek ze specyficznymi przeciwciałami dla izoformy mięśniowej enzymu (AMPD1). Reakcja immunologiczna przeciwciał z białkiem o masie cząsteczkowej około 68 kDa była ewidentna. Pozostałe uwidocznione w elektroforezie białka (Ryc. 13) nie wykazywały reakcji z przeciwciałami anti-AMPD1.



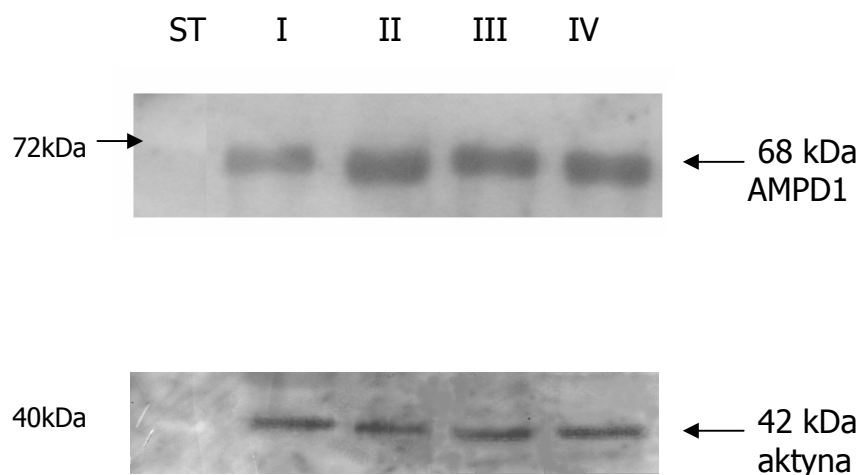
Rycina 14.

Deaminaza AMP serca ludzkiego (serce człowieka dorosłego) – reakcja enzymu z rekombinowanymi przeciwciałami anti-AMPD1.

Oznaczenia ścieżek: ST – wzorce masowe, E – enzym wyizolowany z serca dorosłego człowieka.

Na żel naniesiono po 10 μ g białka.

Rycina 15 przedstawia reakcję immunologiczną (analiza Western blotting) homogenatów serc ludzkich z rekombinowanymi przeciwciałami anty-AMPD1. Jedynym białkiem homogenatu reagującym z wymienionymi przeciwciałami było białko o masie cząsteczkowej 68 kDa.



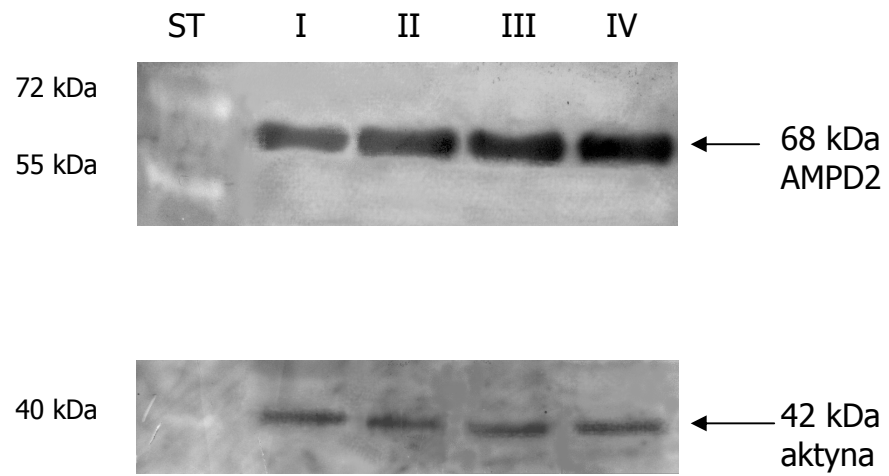
Rycina 15.

Deaminaza AMP serca ludzkiego – reakcja homogenatu serca ludzkiego z rekombinowanymi przeciwciałami anty-AMPD1.

Oznaczenia ścieżek: ST – wzorce masowe, I – homogenat serca płodu, II – homogenat serca noworodka, III – homogenat serca dziecka, IV – homogenat serca człowieka dorosłego.

Na żel naniesiono po 10µg białka.

Ryciny 16 i 17 przedstawiają reakcję immunologiczną (analiza Western blotting) homogenatów serc ludzkich z rekombinowanymi przeciwciałami anty-AMPD2 (Ryc. 16) i anty-AMPD3 (Ryc. 17). Podobnie jak w poprzednim przypadku jedynym białkiem obecnym w homogenatach reagującym z tymi przeciwciałami było białko o masie cząsteczkowej 68 kDa. Zaobserwowane różnice w intensywności prążków mogły wskazywać na zróżnicowany poziom ekspresji izoformy deaminazy AMP w poszczególnych homogenatach (Ryc. 18).

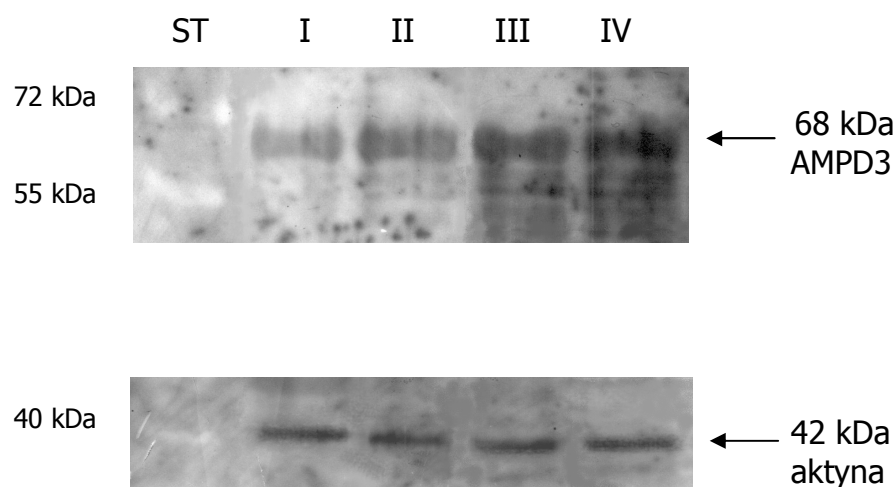


Rycina 16.

Deaminaza AMP serca ludzkiego – reakcja homogenatu serca ludzkiego z rekombinowanymi przeciwciałami anti-AMPD2.

Oznaczenia ścieżek: ST – wzorce masowe, I – homogenat serca płodu, II – homogenat serca noworodka, III – homogenat serca dziecka, IV - homogenat serca człowieka dorosłego.

Na żel naniesiono po 10 μ g białka.



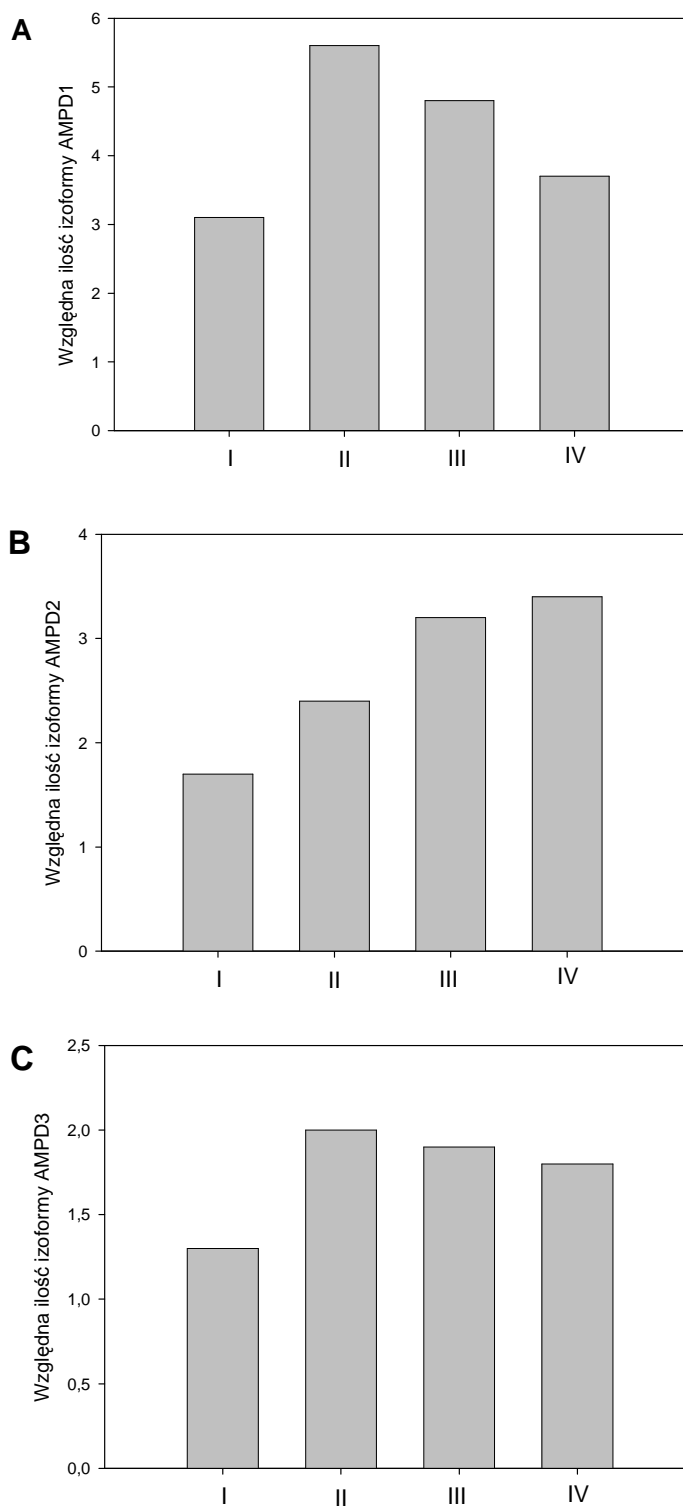
Rycina 17.

Deaminaza AMP serca ludzkiego – reakcja homogenatu serca ludzkiego z rekombinowanymi przeciwciałami anti-AMPD3.

Oznaczenia ścieżek: ST – wzorce masowe, I – homogenat serca płodu, II – homogenat serca noworodka, III – homogenat serca dziecka, IV – homogenat serca dorosłego człowieka.

Na żel naniesiono po 10µg białka.

Przedstawiona na rycinie 18 analiza densytometryczna, wyników badań Western blotting sugeruje, że w przebiegu ontogenezy poziomy izoform deaminazy AMP w sercu ludzkim ulegają zmianom, a interesującą cechą tych zmian wydaje się być malejący w kolejnych okresach ontogenezy poziom izoformy mięśniowej, narastający poziom izoformy wątrobowej i dość niezmienny poziom izoformy erytrocytarnej.



Rycina 18 .

Deaminaza AMP serca ludzkiego – względne poziomy izoformy A) mięśniowej (AMPD1), B) wątrobowej (AMPD2), C) erytrocytarnej (AMPD3) w homogenatach serca w badanych okresach rozwoju osobniczego.

Względny poziom izoform deaminazy AMP oszacowano na podstawie zawartości aktywności w próbie.

Oznaczenia: I – homogenat serca płodu, II – homogenat serca noworodka, III – homogenat serca dziecka, IV - homogenat serca dorosłego człowieka.

4.4. DEAMINAZA AMP SERCA LUDZKIEGO – WŁAŚCIWOŚCI ENZYMU WYIZOLOWANEGO Z SERCA DZIECKA O ZMUTOWANYM GENOTYPIE *AMPD*

W jednym przypadku aktywność deaminazy AMP w homogenacie tkankowym była niższa od przeciętnej. Przeprowadzona analiza genotypowa tej tkanki wykazała obecność mutacji C34T w genie *AMPD1*, ze względu na którą dawca materiału okazał się heterozygotą.

4.4.1. WŁAŚCIWOŚCI CHROMATOGRAFICZNE ENZYMU

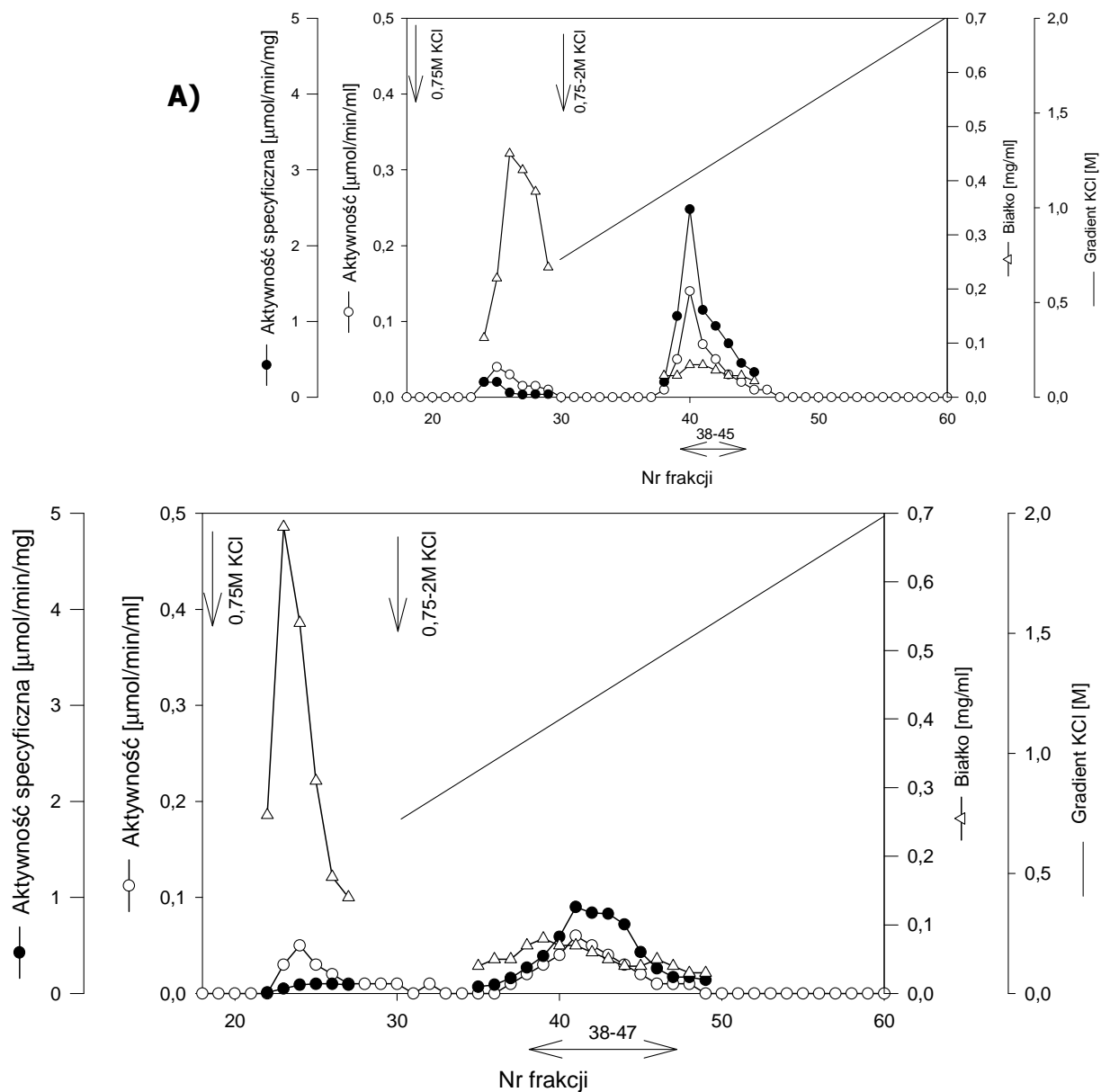
Tabela IV przedstawia aktywność deaminazy AMP w homogenacie tkankowym serca dziecka o genotypie *AMPD* prawidłowym i zmutowanym.

Tabela IV

Aktywność deaminazy AMP w homogenatach serca dziecka.

Okres rozwoju osobniczego	Aktywność specyficzna deaminazy AMP w homogenacie tkankowym [$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$]
dzieciący - P	0,07 (\pm 0,01)
dzieciący - HT	0,05

P – homogenat serca dziecka o prawidłowym genotypie *AMPD*,
HT - homogenat serca dziecka o nieprawidłowym genotypie *AMPD* (mutacja C34T w genie *AMPD1*).



Rycina 19.

Deaminaza AMP serca dziecka o zmutowanym genotypie *AMPD* – chromatografia enzymu na kolumnie z fosfocelulozą.

Insert A) przedstawia odpowiednią chromatografię deaminazy AMP serca dziecka o prawidłowym genotypie *AMPD* (Ryc. 3).

Objętość zbieranych frakcji $\approx 1,2$ ml.

Na rycinie 19 porównano właściwości chromatograficzne deaminazy AMP wyizolowanej z serca dziecka o genotypie *AMPD* zmutowanym i prawidłowym (insert). Jak wynika z przedstawionej ryciny uwolniony z fosfocelulozy enzym serca dziecka o zmutowanym genotypie był mniej aktywny, a uformowany przez ten enzym szczyt aktywności bardziej rozmyty.

Jak widać w Tabeli V, otrzymane preparaty enzymatyczne po oczyszczeniu na fosfocelulozie posiadały znacznie różniące się aktywności.

Tabela V

Aktywności preparatów enzymatycznych uzyskanych po chromatografii na fosfocelulozie.

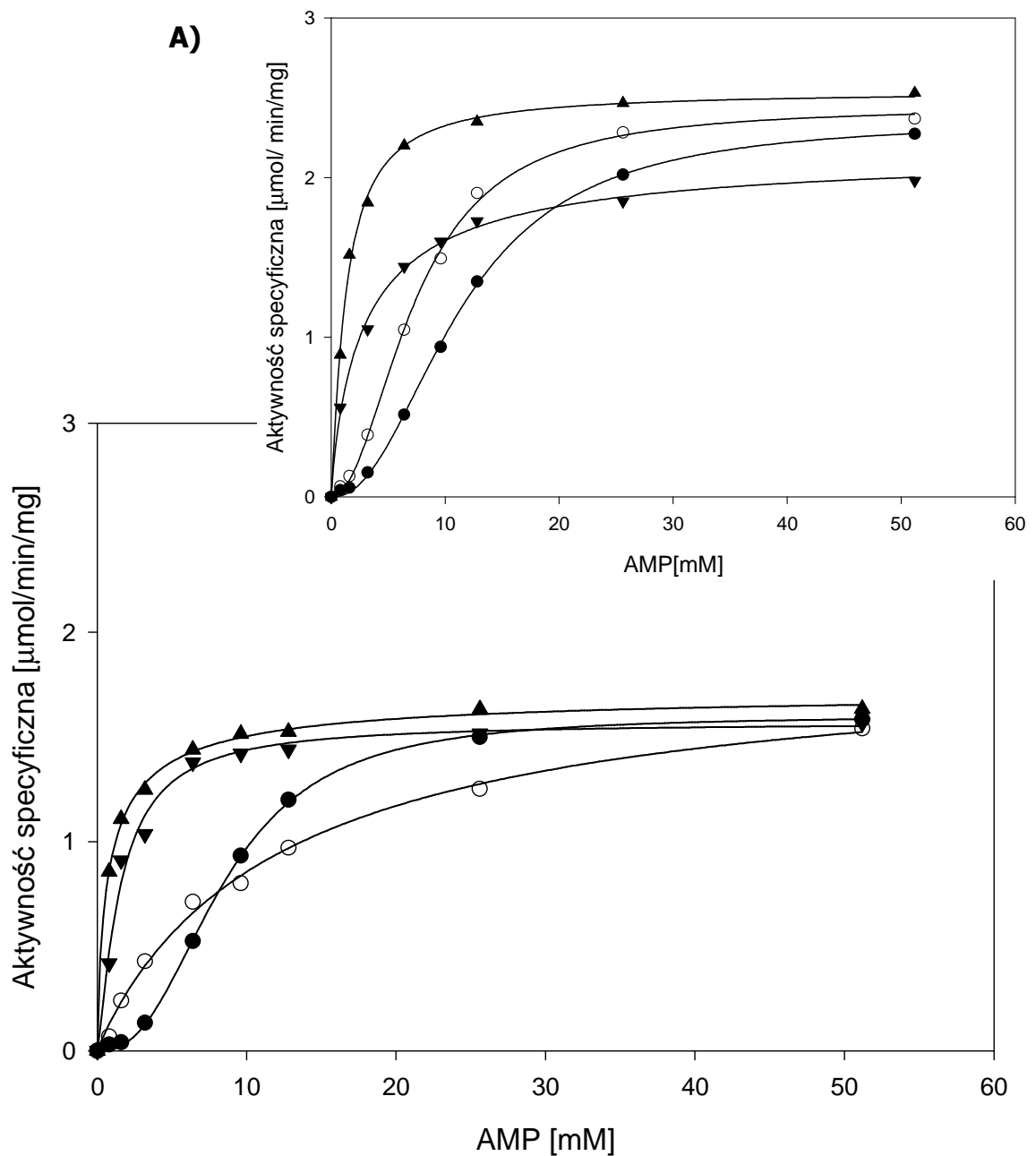
Okres rozwoju osobniczego	Aktywność specyficzna deaminazy AMP [$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ białka]
dzieciący - P	1,4 (\pm 0,2)
dzieciący - HT	0,5

P – preparat enzymatyczny serca dziecka o prawidłowym genotypie *AMPD*,
HT - preparat enzymatyczny serca dziecka o zmutowanym genotypie *AMPD*.

4.4.2. WŁAŚCIWOŚCI KINETYCZNO – REGULACYJNE ENZYMU

4.4.2.1. KINETYKA WYSYCENIA ENZYMU SUBSTRATEM

Rycina 20 oraz Tabela VI ilustrują właściwości kinetyczno-regulacyjne deaminazy AMP wyizolowanej z serca dziecka o zmutowanym genotypie *AMPD*.



Rycina 20.

Deaminaza AMP serca dziecka o zmutowanym genotypie *AMPD* – właściwości kinetyczno-regulacyjne enzymu.

Insert A) przedstawia właściwości kinetyczno-regulacyjne deaminazy AMP serca dziecka o prawidłowym genotypie *AMPD* (Ryc. 7).

Oznakowanie krzywych kinetycznych - ○ krzywa kontrolna, ▲ krzywa w obecności 1 mM ATP, ▼ krzywa w obecności 1 mM ADP, ● krzywa w obecności 2,5 mM Pi.

Tabela VI

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

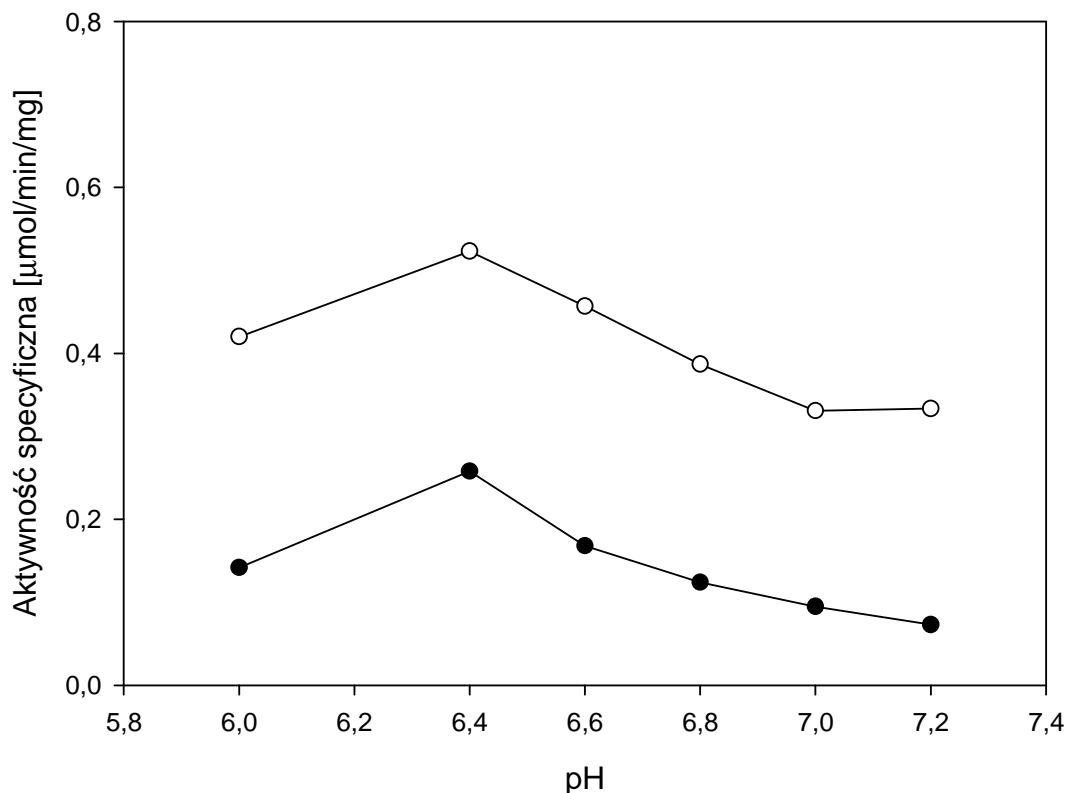
Grupa Dodany efektor	$S_{0.5}$ (mM)		V_{max} ($\mu\text{mol}/\text{min}$)		n_H	
	P	HT	P	HT	P	HT
Brak efektora (kontrola)	7,3	12,5	2,4	1,9	2,3	0,8
ATP	1,3	0,8	2,5	1,7	1,2	1,0
ADP	3,0	1,5	2,2	1,6	1,0	1,3
Pi	11,4	8,4	2,3	1,6	2,2	2,5

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

Jak wynika z przedstawionych na rycinie 20 oraz w Tabeli VI danych, krzywa wysycenia enzymu substratem dla deaminazy AMP z serca dziecka o zmutowanym genotypie *AMPD* prezentowała profil nieregularnej hiperboli ($n_H \approx 0,8$), ze stałą półwysycenia ($S_{0.5}$) niemal dwukrotnie większą od stałej półwysycenia wyznaczonej dla enzymu serca dziecka o genotypie *AMPD* prawidłowym. W obecności 1 mM ATP, 1 mM ADP oraz w obecności 2,5 mM ortofosforanu wartości $S_{0.5}$ wyznaczone dla enzymu pochodzącego z serca dziecka o zmutowanym genotypie *AMPD* były wyraźnie niższe od odpowiednich stałych wyznaczonych dla enzymu pochodzącego z serca dziecka o prawidłowym genotypie *AMPD*.

4.4.2.2. WPŁYW ZMIAN STĘŻENIA JONÓW WODOROWYCH (pH)

Rycina 21 przedstawia wpływ pH na aktywność deaminazy AMP wyizolowanej z serca dziecka o genotypie *AMPD* prawidłowym i zmutowanym.



Rycina 21.

Deaminaza AMP serca dziecka o genotypie *AMPD* prawidłowym ○ i zmutowanym ● - wpływ zmian pH.

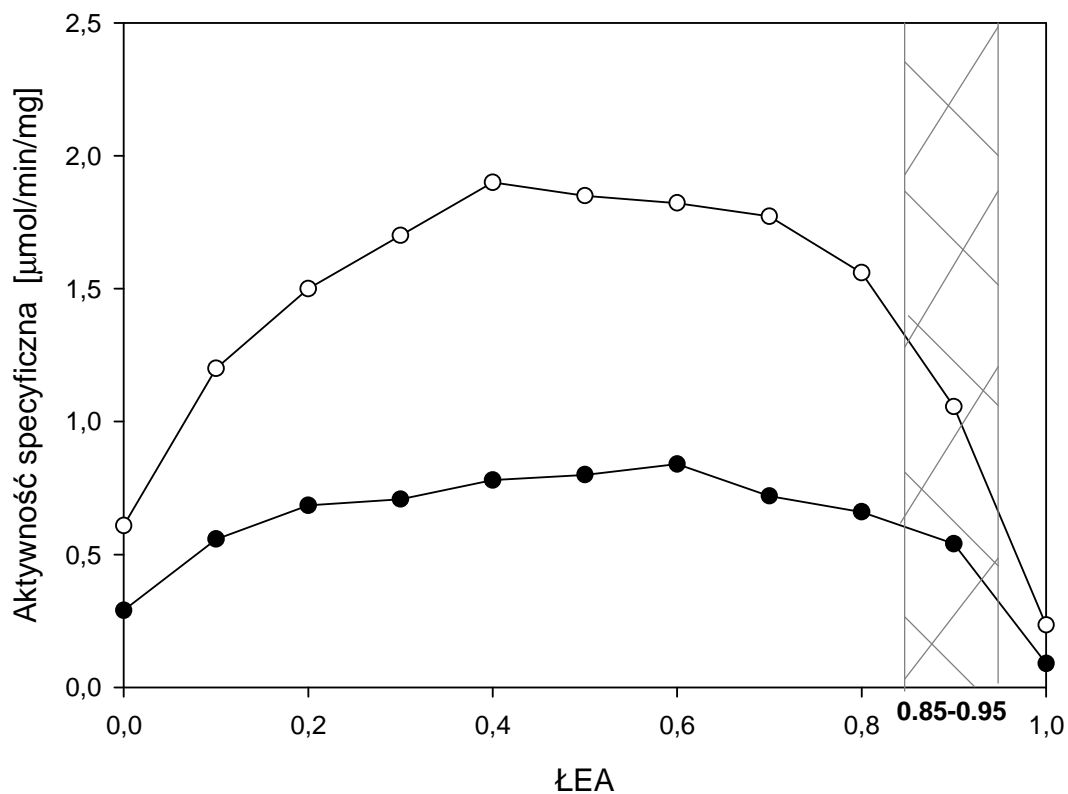
Aktywność enzymu mierzono w 0,1 M buforze kakodylanowym przy 2,5 mM stężeniu substratu.

Symbole przedstawione na rycinie stanowią średnie z trzech niezależnych oznaczeń, Wartości S.D. dla tych oznaczeń mieściły się w zakresie ±10% wyliczonych wartości średnich.

Jak wynika z ryciny 21 deaminaza AMP wyizolowana z serca dziecka o genotypach prawidłowym i zmutowanym reagowała podobnie na zmiany stężenia jonów wodorowych, wykazując optimum aktywności w pH bliskim 6,4.

4.4.2.3. WPŁYW ZMIAN WARTOŚCI ŁADUNKU ENERGETYCZNEGO ADENYLANÓW (ŁEA)

Rycina 22 ilustruje wpływ zmian wartości ŁEA na aktywność deaminazy AMP serca dziecka o genotypie *AMPD* prawidłowym i zmutowanym.



Rycina 22.

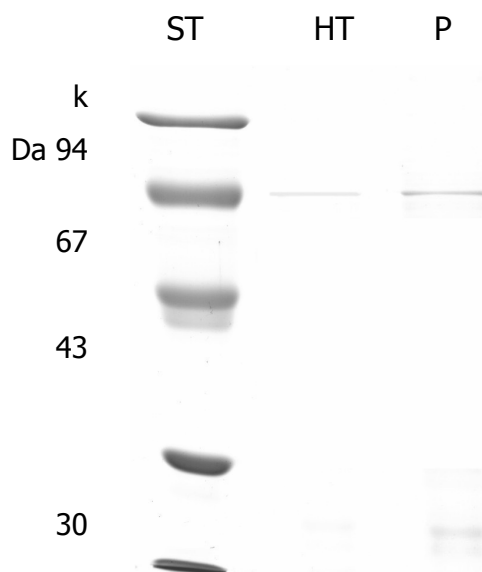
Deaminaza AMP serca dziecka o genotypie prawidłowym ○ i zmutowanym ● - wpływ zmian wartości ładunku energetycznego adenylanów (ŁEA) na aktywność enzymu.

Symbole przedstawione na rycinie stanowią średnie z trzech niezależnych oznaczeń, Wartości S.D. dla tych oznaczeń mieściły się w zakresie $\pm 10\%$ wyliczonych wartości średnich.

Jak wynika z ryciny 22 deaminaza AMP wyizolowana z serca dziecka o zmutowanym genotypie, w porównaniu z enzymem wyizolowanym z serca dziecka o prawidłowym genotypie, reagowała w sposób umiarkowany na zmiany wartości ŁEA. Podobne różnice w sposobie reagowania obydwu enzymów na zmiany ŁEA obserwowano w przedziale fizjologicznych zmian wartości tego ładunku (0,85-0,95).

4.4.3. ROZDZIAŁ ELEKTROFORETYCZNY ORAZ ODPOWIEDŹ IMMUNOLOGICZNA ENZYMU

Rycina 23 przedstawia rozdział elektroforetyczny deaminazy AMP serca dziecka o genotypie *AMPD* prawidłowym i zmutowanym.



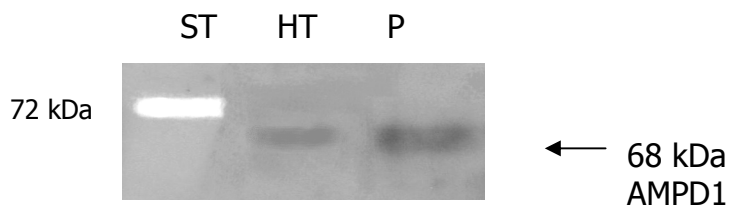
Rycina 23.

Deaminaza AMP serca dziecka o genotypie *AMPD* prawidłowym (P) i zmutowanym (HT) – rozdział elektroforetyczny enzymu.

Oznaczenia ścieżek: ST – wzorce masowe, P – enzym wyizolowany z serca dziecka o prawidłowym genotypie, HT – enzym wyizolowany z serca dziecka o zmutowanym genotypie (heterozygota).

Na żel naniesiono po 10µg białka.

Jak pokazano na rycinie 23, elektroforeza każdego z wymienionych enzymów uwidoczniała w żelu białko o masie cząsteczkowej 68 kDa, reagujące z przeciwciałami anti-AMPD1 (Ryc. 24). Nasilenie intensywności prążków było proporcjonalne do ilości enzymu uwidocznionego w trakcie elektroforezy.



Rycina 24.

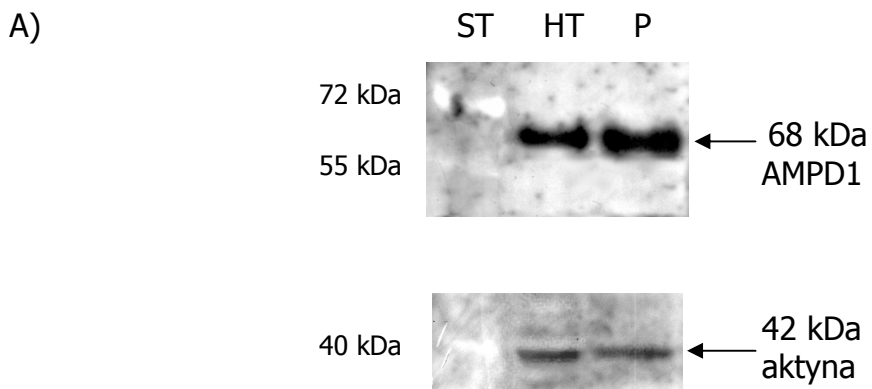
Deaminaza AMP serca dziecka o genotypie prawidłowym (P) i zmutowanym (HT) – reakcja enzymu z przeciwciałami anti-AMPD1.

Oznaczenia ścieżek: ST – wzorce masowe, P – enzym wyizolowany z serca dziecka o prawidłowym genotypie, HT – enzym wyizolowany z serca dziecka o zmutowanym genotypie (heterozygota).

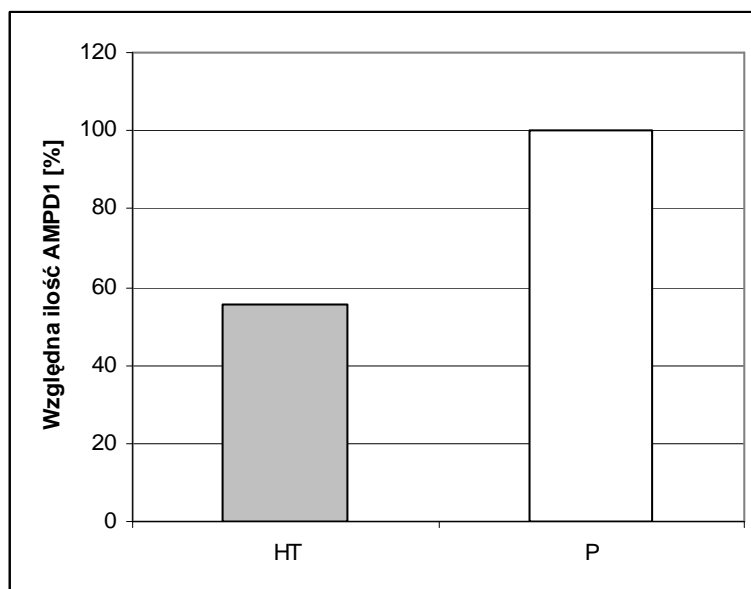
Na żel naniesiono po 10µg białka.

Ryciny 25 A- 27 A przedstawiają reakcje homogenatów tkankowych serca dziecka o genotypie *AMPD* prawidłowym i zmutowanym, z rekombinowanymi, specyficznymi dla poszczególnych izoform deaminazy AMP przeciwciałami (analiza Western blotting).

Analiza densytometryczna (Ryc. 25 B - 27 B) uzyskanych wyników pozwoliła oszacować intensywność odpowiedzi immunologicznej homogenatu tkankowego serca dziecka o zmutowanym genotypie z przeciwciałami anti-AMPD1, anti-AMPD2, anti-AMPD3, odpowiednio na 60, 60 i 90% odpowiedzi immunologicznej homogenatu serca dziecka o prawidłowym genotypie.



B)



Rycina 25.

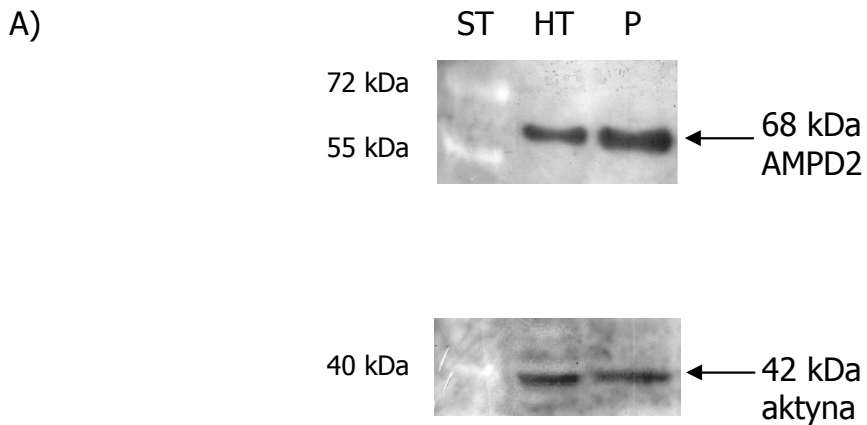
Deaminaza AMP serca dziecka o genotypie prawidłowym i zmutowanym

A) reakcja homogenatu tkankowego z przeciwciałami anty – AMPD1

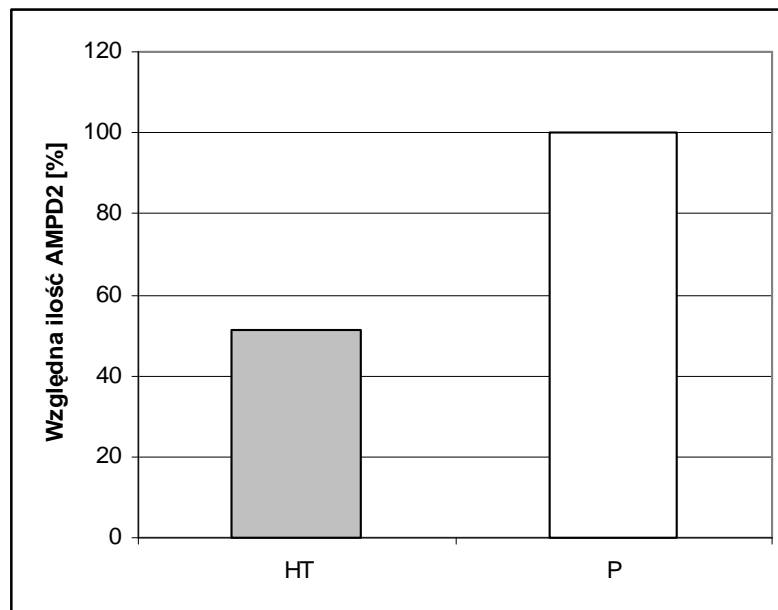
B) oszacowanie densytometryczne intensywności reakcji immunologicznej.

Oznaczenia ścieżek: ST – wzorce masowe, P - genotyp prawidłowy, HT – genotyp nieprawidłowy (heterozygota). Próby zawierały po 10µg białka całkowitego.

Względny poziom izoforny mięśniowej deaminazy AMP oszacowano na podstawie zawartości aktyny w próbce.



B)



Rycina 26.

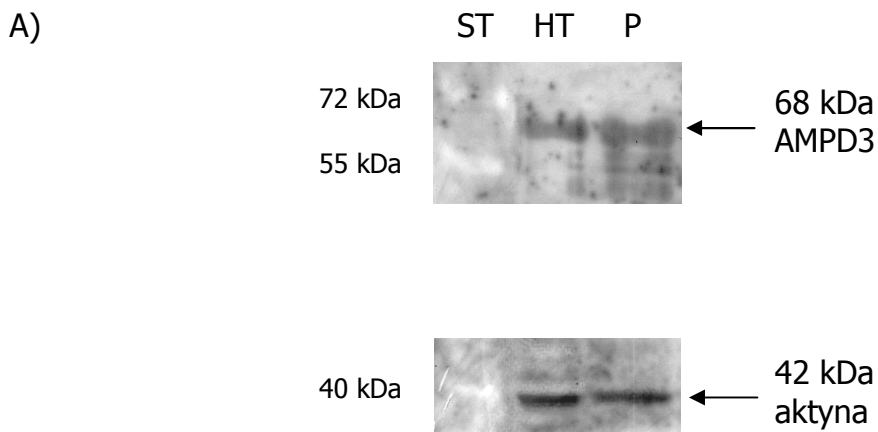
Deaminaza AMP serca dziecka o genotypach prawidłowym i zmutowanym

A) reakcja homogenatu tkankowego z przeciwciałami anty – AMPD2

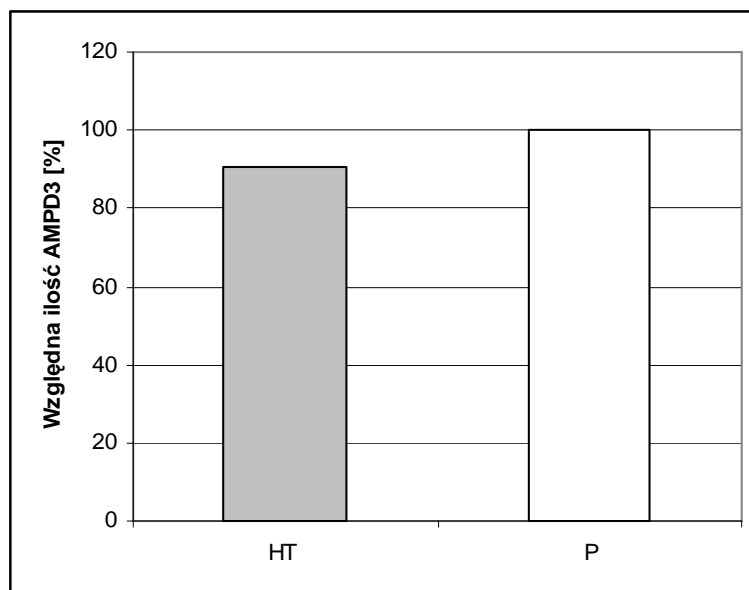
B) oszacowanie densytometryczne intensywności reakcji immunologicznej.

Oznaczenia ścieżek: ST – wzorce masowe, P – genotyp prawidłowy, HT – genotyp nieprawidłowy (heterozygota). Próby zawierały po 10µg białka całkowitego.

Względny poziom izoforny wątrobowej deaminazy AMP oszacowano na podstawie zawartości aktyny w próbie.



B)



Rycina 27.

Deaminaza AMP serca dziecka o genotypach prawidłowym i zmutowanym

A) reakcja homogenatu tkankowego z przeciwciałami anty – AMPD3

B) oszacowanie densytometryczne intensywności reakcji immunologicznej.

Oznaczenia ścieżek: ST – wzorce masowe, P - genotyp prawidłowy, HT – genotyp nieprawidłowy (heterozygota). Próby zawierały po 10µg białka całkowitego. Względny poziom izoformy erytrocytarnej deaminazy AMP oznaczonej na podstawie zawartości aktyny w próbie.

5. DYSKUSJA

Podczas rozdziału chromatograficznego izolowanych deaminaz AMP z serca płodu, noworodka, dziecka i człowieka dorosłego zaobserwowano w eluatach z kolumny dwa, wyraźnie od siebie oddzielone szczyty aktywności (Ryc. 1 – 4). Wypłukiwany stepem KCl szczyt pierwszy, wykazywał niską aktywność specyficzną i zawierał tylko niewielką część uwolnionej aktywności. Wypłukiwany gradientem KCl szczyt drugi, zasadniczy, był bardziej aktywny i zawierał większość uwolnionej aktywności.

Odmienne w stosunku do profili elucyjnych deaminazy AMP wyizolowanej z serca płodu, dziecka i człowieka dorosłego (Ryc. 1, 3, 4), przedstawiał się profil elucyjny enzymu wyizolowanego z serca noworodka (Ryc. 2). Uwolniona gradientem KCl aktywność była tutaj wyraźnie wyższa (Tabela II), a enzym eluował z fosfocelulozy później (frakcje 45-66) niż obserwowano to w innych okresach rozwojowych (frakcje 37-48).

Właściwości kinetyczno-regulacyjne wszystkich rozwojowych form deaminazy AMP, charakteryzowała podobna kinetyka wysycenia enzymu substratem oraz podobny profil regulacyjny. W każdym z przypadków zaobserwować się dało wyraźny, aktywujący wpływ ATP i ADP oraz hamujący wpływ ortofosforanu. Widocznym znakiem regulacyjnego wpływu ATP lub ADP była hiperbolizacja krzywej wysycenia enzymu substratem oraz spadek wartości stałej półwysycenia ($S_{0.5}$). Natomiast w obecności ortofosforanu następowało pogłębienie sigmoidalnego charakteru tej krzywej oraz wzrost wartości stałej $S_{0.5}$ (Tabela III). Porównanie właściwości regulacyjnych form rozwojowych deaminazy AMP, badanych w 0,8 mM stężeniu substratu, pozwoliło uwidocznić bardziej wyraźnie różnice w oddziaływaniu efektorów allosterycznych na formy rozwojowe enzymu (Ryc.9).

Jak to pokazują Ryciny 10 i 11, na aktywność rozwojowych form deaminazy AMP miały także wpływ pH środowiska inkubacyjnego (Ryc. 10) oraz wartości ładunku energetycznego adenylanów (łEA) (Ryc. 11).

Przedstawione powyżej odmienności w zachowaniu enzymu wyizolowanego z serca noworodka sugerują, że w rozwoju osobniczym człowieka deaminaza AMP z serca zmienia swój skład izozymowy, podobnie jak obserwuje się w przypadku enzymu z serca szczura (75) oraz mięśnia szkieletowego szczura (66,69) i człowieka (65).

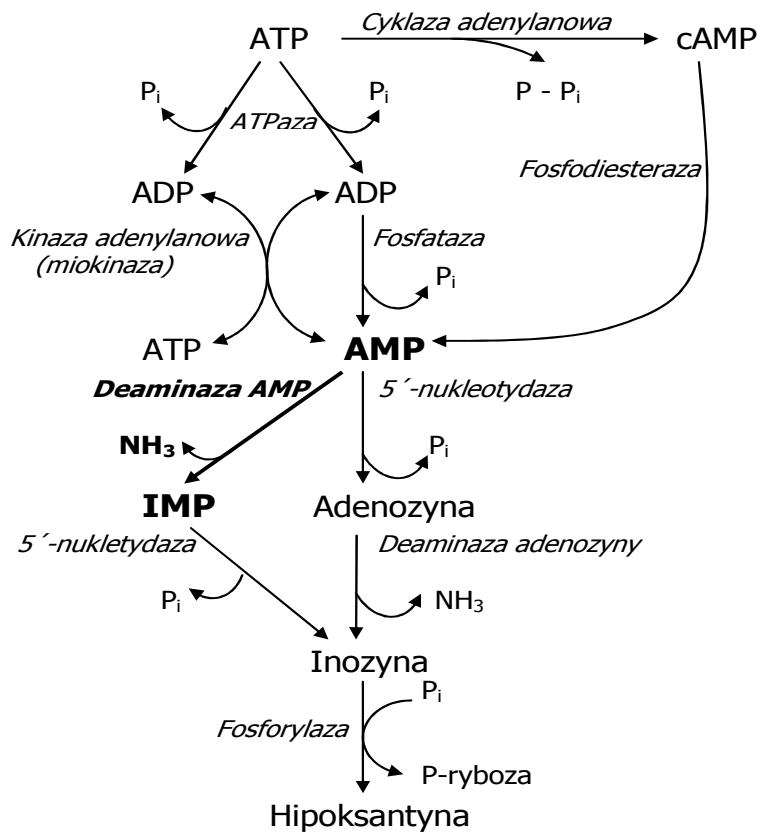
Z badań przeprowadzonych na enzymie rekombinowanym wiadomo, że masa „podjednostkowa” natywnej deaminazy AMP jest różna i w zależności od rodzaju izozymu, wynosi od 88 do 101 kDa (13,78,79).

Przedstawione w pracy wyniki badań elektroforetycznych podobnego zróżnicowania „podjednostkowej” masy cząsteczkowej enzymu sercowego jednak nie wykazały. Na każdym z etapów ontogenezy elektroforeza enzymu po chromatografii uwidaczniała białko o masie cząsteczkowej około 68 kDa (Ryc. 13). Obecnie wiadomo (14), że białko o tej masie reprezentuje najpewniej podjednostkę „kadłubową” enzymu, zredukowaną o labilny, izozymowo specyficzny fragment N-terminalny. Pomimo identycznych lub bardzo podobnych wyników elektroforezy, przeprowadzona na ich podstawie analiza Western blotting, dała różne wyniki. Różnice dotyczyły natężenia reakcji uwidocznionego w elektroforezie białka, ze specyficznymi przeciwciałami dla poszczególnych izoform deaminazy AMP (Ryc. 15-17). Sugerują one zróżnicowany, zmieniający się w przebiegu ontogenezy udział izoform w tworzeniu aktywności ogólnej. To zaś, z uwagi na odmienne właściwości kinetyczno-regulacyjne izoform, mogłoby sugerować, zachodzące w trakcie rozwoju osobniczego zmiany w specyfice metabolicznej serca. Przyjmując powyższe założenia można więc przypuszczać, że wysokie poziomy wykazującej wysoką sprawność katalityczną (niska wartość $S_{0.5}$ wobec substratu) izoformy mięśniowej (AMPD1) w sercu noworodka i dziecka, odpowiadają specyfice metabolicznej serca w tych okresach rozwojowych. W sercu człowieka dorosłego, którego specyfika metabolizmu być może jest już inna, dla katabolizmu energetycznego serca, bardziej odpowiednia być może mniej sprawna katalitycznie izoforma wątrobowa (wysoka wartość $S_{0.5}$ wobec substratu) (Ryc. 18).

Charakterystyczną cechą metabolizmu energetycznego serca jest duży dobowy obrót energii i dla podtrzymania funkcji serca zasoby komórkowego ATP muszą być zatem ciągle uzupełniane (80-82).

Resynteza ATP w mięśniu sercowym przebiega podobnie jak w mięśniu szkieletowym i może dokonywać się w wyniku: 1) fosforylacji ADP (w reakcji katalizowanej przez miokinazę); 2) defosforylacji fosfokreatyny (w reakcji katalizowanej przez kinazę kreatyny); 3) glikolizy (której źródłem może być glukoza pochodząca z rozkładu pokarmowych węglowodanów lub mięśniowego glikogenu), lub też 4) β -oksydacji wolnych kwasów tłuszczowych. Bezpośrednim źródłem komórkowego ATP w mięśniach jest fosfokreatyna (fosfagen), której

natychmiastowa defosforylacja zapobiega obniżeniu komórkowego stężenia ATP w stanach nagłego zapotrzebowania energetycznego tkanki (83).



Rycina 4. Degradacja nukleotydów purynowych w sercu (wg. M. Żydowo, Int. J. Biochem 1976 (84)).

Zachodząca podczas pracy serca hydroliza ATP oraz jego resynteza są ze sobą ściśle sprzężone. Utworzony w reakcji katalizowanej przez miokinazę AMP może zaś być dalej deaminowany do IMP (deaminaza AMP) lub też defosforylowany do adenozyzny (5'-nukleotydaza) (Ryc. 4).

Degradacja AMP w tkance, wymienionymi wyżej metabolicznymi drogami, zależy od gatunkowo i tkankowo zróżnicowanej ekspresji oraz od właściwości kinetyczno-regulacyjnych deaminazy AMP i 5'-nukleotydy. Spośród siedmiu poznanych dotąd izoform 5'-nukleotydy (85,86) (c-N-IA, c-N-IB, c-N-II, c-N-III, c-d-N, m-d-N, e-N), w mięśniu sercowym ssaków, poza izoformą błonową (e-N), wykazano jedynie aktywności dwu izoform cytozoolowych (c-N-I i c-N-II), preferujących jako substrat, odpowiednio AMP i IMP. Izoformy te różnią się między sobą specyficnością substratową oraz właściwościami kinetyczno-regulacyjnymi (87).

Preferującej IMP izoformie c-N-II, ze względu na jej charakterystykę kinetyczno-regulacyjną, przypisuje się rolę w utrzymywaniu komórkowego stężenia IMP na niskim, mikromolowym poziomie. Kinetyka katalizowanej przez c-N-II hydrolizy IMP jest hiperboliczna, natomiast hydrolizy AMP sigmoidalna. Aktywatorem enzymu jest ATP, zaś inhibitorem ortofosforan (88). W nieobecności ATP K_m dla IMP oraz AMP przyjmuje wysokie, milimolowe wartości. Jednak w obecności stężeń ATP, spotykanych w prawidłowo ukrwionym kardiomiocycie (stężenie AMP w kardiomiocycie szczura wynosi około 11 mM), wartości K_m maleją do kilkudziesięciomikromolowych (89-91), a spadkowi temu towarzyszy znaczący wzrost szybkości maksymalnej reakcji. Niezależnie od tego w opisanych warunkach, sigmoidalna wobec AMP kinetyka wysycenia enzymu substratem ulega hiperbolizacji. Opisane powyżej fakty uzasadniają przeświadczenie o roli jaką c-N-II może pełnić w katabolizmie energetycznym serca.

W przeciwieństwie do c-N-II, głównym aktywatorem preferującej AMP izoformy cytozolowej c-N-I jest ADP. Ortofosforan hamuje aktywność tego enzymu, zaś ATP na jego aktywność nie ma wpływu. W nieobecności ADP, powinowactwo c-N-I wobec AMP jest niskie a K_m wykazuje wysokie wartości (kilkunastomilimolowe), przewyższające wielokrotnie komórkowe stężenie AMP. Jednak w warunkach niedokrwienia, gdy komórkowe stężenia AMP (substratu) i ADP (aktywatora) wzrastają, K_m izoformy c-N-I wobec AMP znacząco spada, zaś temu obniżeniu towarzyszy wzrost szybkości maksymalnej reakcji. Powoduje to, że w warunkach niedokrwienia, degradacja komórkowego AMP z udziałem izoformy c-N-I może mieć znaczenie metaboliczne (87,92). Jest to prawdopodobne tym bardziej, jeśli wziąć pod uwagę fakt, że c-N-I w mniejszym stopniu niż c-N-II jest podatna na inhibicję fosforanową. Można więc zakładać, że degradacja AMP w sercu człowieka przebiega z udziałem obydwu cytozolowych izoform 5'-nukleotydu. Dokładniejsza ocena metabolicznej roli każdej z izoform wymaga jednak znajomości nie tylko aktualnych stężeń ATP, ADP, AMP, IMP i ortofosforanu, lecz także wartości pH w komórce sercowej (91,93).

W niedokrwionym sercu szczura katabolizm AMP przebiega głównie z udziałem 5'-nukleotydu (81,94), zaś w niedokrwionym sercu świnki morskiej z udziałem deaminazy AMP (94). W sercu człowieka udział wymienionych enzymów w degradacji AMP nie jest tak zróżnicowany. Około 70% AMP w sercu ludzkim przekształca się do adenozyiny, a tylko około 30% do kwasu inozynowego. Mimo to

udział deaminazy AMP pozostaje jednak znaczący w katabolizmie energetycznym serca, nawet w warunkach niedokrwienia (95).

W mięśniu szkieletowym człowieka dorosłego o prawidłowym genotypie *AMPD* ekspresja izoformy AMPD1 jest wyraźnie dominująca. U ludzi dorosłych z nieprawidłowym genotypem *AMPD* (z mutacją C34T), izoformy AMPD1 w mięśniu szkieletowym praktycznie nie ma (u homozygoty), lub też jej poziom jest wyraźnie obniżony (u heterozygoty) (48). W mięśniu sercowym człowieka dorosłego o prawidłowym genotypie *AMPD* ekspresja izoformy AMPD1 zachodzi, lecz w porównaniu z mięśniem szkieletowym, jest ona niewielka. W sercu dziecka o zmutowanym genotypie *AMPD*, poziom izoformy AMPD1, w stosunku do poziomu obserwowanego w sercu dziecka o prawidłowym genotypie, jest znacząco obniżony (Ryc. 25). Co ciekawe w sercu tym obniżony jest również poziom izoformy AMPD2 (Ryc. 26), zaś poziom izoformy AMPD3 pozostaje niezmienny (Ryc. 27).

Zgodnie z prezentowanymi obecnie poglądami kardioprotekcyjny wpływ mutacji C34T w genie *AMPD1*, jest następstwem obniżonej aktywności deaminazy AMP oraz związanej z tym wzmożonej produkcji adenozyiny. Z przeprowadzonych, na populacji o prawidłowym i zmutowanym genotypie *AMPD* badań wynika, że powysiłkowy wzrost stężenia adenozyiny we krwi krążącej, staje się zauważalny jedynie u osób z homozygotyczną odmianą mutacji C34T. Zatem nie tylko ogólnoustrojowa (mająca źródło w mięśniach szkieletowych), ale i lokalna (mająca źródło w mięśniu sercowym) nadprodukcja adenozyiny odgrywa rolę w poprawie przeżywalności osób z niewydolnością serca (96,97).

Przedstawione w rozprawie wyniki doświadczeń wskazują, że w przebiegu ontogenezy, w mięśniu sercowym człowieka, podobnie jak w ludzkim mięśniu szkieletowym, skład izozymowy deaminazy AMP ulega zmianie. Szczegółowy obraz tych zmian będzie jasny i pełny dopiero po wykonaniu dalszych badań metabolicznych i molekularnych, pozwalających scharakteryzować specyfikę metabolizmu sercowego w różnych okresach rozwoju osobniczego oraz ocenić rolę izoform 5'-nukleotydu i deaminazy AMP w tym metabolizmie.

6. WNIOSKI

Na podstawie przeprowadzonych badań można wyciągnąć następujące wnioski:

1. Deaminaza AMP serca noworodka prezentuje odmienne niż w pozostałych okresach rozwoju osobniczego właściwości chromatograficzne i kinetyczno-regulacyjne. Zaobserwowane różnice wskazują na zachodzącą w tym okresie ontogenezy zmianę składu izozymowego enzymu.

2. W tworzeniu aktywności deaminazy AMP w sercu ludzkim uczestniczą wszystkie trzy (AMPD1, AMPD2, AMPD3) izozymy. Stopień ich uczestnictwa jest jednak zróżnicowany i w trakcie ontogenezy podlega zmianom. Zmiany te odzwierciedlać mogą specyfikę metaboliczną serca w kolejnych etapach ontogenezy.

3. W sercu dziecka o zmutowanym genotypie *AMPD* (heterozygota ze względu na mutację C34T) aktywność deaminazy AMP jest obniżona, zaś wyizolowany z tego serca enzym, prezentuje odmienne, w porównaniu z sercem dziecka o prawidłowym genotypie *AMPD*, właściwości kinetyczne i regulacyjne.

4. W sercu dziecka o zmutowanym genotypie *AMPD* obecne są wszystkie trzy izozymy enzymu. W porównaniu z sercem dziecka o prawidłowym genotypie *AMPD* poziomy izoform AMPD1 i AMPD2 są tutaj jednak wyraźnie obniżone.

7. STRESZCZENIE

Celem prezentowanej pracy doktorskiej było zbadanie właściwości fizyko-chemicznych i immunologicznych deaminazy AMP serca ludzkiego w różnych okresach (okres płodowy, noworodkowy, dziecięcy, dojrzały) rozwoju osobniczego. Dodatkowym, celem pracy było zbadanie właściwości fizyko-chemicznych i immunologicznych enzymu wyizolowanego z serca dziecka o zmutowanym genotypie *AMPD* (mutacja C34T genu *AMPD1*).

Przeprowadzone badania wykazały, że w noworodkowym okresie rozwoju osobniczego aktywność oraz niektóre właściwości chromatograficzne i kinetyczno-regulacyjne deaminazy AMP ulegają zmianom. Zaobserwowane zmiany wskazują na zmieniający się w ontogenezie skład izozymowy enzymu. Analiza Western blotting homogenatów tkankowych „dojrzewającego” serca wykazała w nich obecność wszystkich trzech izozymów (mięśniowego, wątrobowego oraz erytrocytarnego) deaminazy AMP. Zróżnicowany i zmieniający się skład izozymowy serca ludzkiego ilustrować może zmieniająca się w kolejnych etapach ontogenezy specyfikę metaboliczną serca.

W sercu dziecka o zmutowanym genotypie *AMPD* (mutacja C34T o typie heterozygotycznym) aktywność deaminazy AMP jest niższa, a wyizolowany enzym wykazywał odmienne niż enzym serca dziecka o prawidłowym genotypie *AMPD*, właściwości chromatograficzne i kinetyczno-regulacyjne. Analiza Western blotting homogenatu tkankowego tego serca wykazała obniżone poziomy izozymów *AMPD1* i *AMPD2*, w stosunku do serca dziecka o prawidłowym genotypie.

8. PIŚMIENICTWO

1. Lazou A.: Adenylate metabolizing enzymes in vertebrate tissues. *Comp. Biochem. Physiol.* 1989,92,175-180.
2. Makarewicz W., Stankiewicz A.: AMP-aminohydrolase of human skeletal muscle: partial purification and properties. *Biochem. Med.* 1974,10,180-197.
3. Purzycka J.: AMP and adenosine aminohydrolases in rat tissues. *Acta Biochim. Pol.* 196,29,83-93.
4. Purzycka J.: Deaminases of adenylic acid and adenosine. *Postepy Biochem.* 1964,10,359-67.
5. Stankiewicz A.: AMP-deaminase. *Postepy Biochem.* 1978,24,243-264.
6. Umiastowski J.: AMP aminohydrolase in muscle of some vertebrates and invertebrates. *Acta Biochim. Pol.* 1964,11, 459-464.
7. Yabuki N., Ashihara H.: Catabolism of adenine nucleotides in suspension-cultured plant cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1991,1073,474-480.
8. Merkler D. J., Wali A. S., Taylor J., Schramm V. L.: AMP deaminase from yeast. Role in AMP degradation, large scale purification, and properties of the native and proteolyzed enzyme. *J. Biol. Chem.* 1989,264,21422-21430.
9. Meyer S. L., Kvalnes-Krick K. L., Schramm V. L.: Characterization of AMD, the AMP deaminase gene in yeast. Production of amd strain, cloning, nucleotide sequence, and properties of the protein. *Biochemistry* 1989,28,8734-8743.
10. Gross M., Morisaki H., Morisaki T., Holmes E. W.: Identification of functional domains in AMPD1 by mutational analysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994,205,1010-1017.
11. Morisaki T., Sabina R. L., Holmes E. W.: Adenylate deaminase. A multigene family in humans and rats. *J. Biol. Chem.* 1990, 265,11482-11486.
12. Bausch-Jurken M. T., Mahnke-Zizelman D. K., Morisaki T., Sabina R. L.: Molecular cloning of AMP deaminase isoform L. Sequence and bacterial expression of human AMPD2 cDNA. *J. Biol. Chem.* 1992,267,22407-22413.
13. Mahnke-Zizelman D. K., Sabina R. L.: Cloning of human AMP deaminase isoform E cDNAs. Evidence for a third AMPD gene exhibiting alternatively spliced 5'-exons. *J. Biol. Chem.* 1992,267,20866-20877.
14. Sabina R. L., Mahnke-Zizelman D. K.: Towards an understanding of the functional significance of N-terminal domain divergence in human AMP deaminase isoforms. *Pharmacol. Ther.* 2000,87,279-283.

15. Haas A. L., R. L. Sabina.: Expression, purification and inhibition of in vitro proteolysis of human AMPD2 (isoform L) recombinant enzymes. *Protein Expr.Purif.* 2003,27,293-303.
16. Ranieri-Raggi M., Raggi A.: Effects of storage on activity and subunit structure of rabbit skeletal-muscle AMP deaminase. *Biochem.J.* 1980,189,367-368.
17. Szydlowska M., Chodorowski Z., Rybakowska I., Nagel-Starczynowska G., Kaletha K.: Full-size form of human liver AMP-deaminase? *Mol.Cell Biochem.* 2004,266,133-137.
18. Coffee C. J., Kofke W. A.: Rat muscle 5'-adenylic acid aminohydrolase. I. Purification and subunit structure. *J.Biol.Chem.* 1975,250,6653-6658.
19. Smiley K. L., Berry A. J., Suelter C. H.: An improved purification, crystallization, and some properties of rabbit muscle 5'-adenylic acid deaminase. *J.Biol.Chem.* 1967,242,2502-2506.
20. Sabina R. L., Swain J. L., Olanow C. W., Bradley W. G., Fishbein W. N., DiMauro S., Holmes E. W.: Myoadenylate deaminase deficiency. Functional and metabolic abnormalities associated with disruption of the purine nucleotide cycle. *J.Clin.Invest.* 1984,73,720-730.
21. Ashby B., Frieden C.: Interaction of AMP-aminohydrolase with myosin and its subfragments. *J.Biol.Chem.* 1977,252,1869-1872.
22. Ogasawara N., Goto H., Yamada Y.: Effects of various ligands on interaction of AMP deaminase with myosin. *Biochim Biophys.Acta.* 1978,524,442-446.
23. Ogawa H., Shiraki H., Matsuda Y., Nakagawa H.: Interaction of adenylosuccinate synthetase with F-actin. *Eur.J.Biochem.* 1978,85,331-337.
24. Aragon J. J., Lowenstein J. M.: 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.* 1980,110,371-377.
25. Atkinson D. E.: The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. *Biochemistry* 1968,7,4030-4034.
26. Chapman A. G., Atkinson D. E.: Stabilization of adenylate energy charge by the adenylate deaminase reaction. *J.Biol.Chem.* 1973,248,8309-8312.
27. Lowenstein J., Tornheim K.: Ammonia production in muscle: the purine nucleotide cycle. *Science* 1971,171,397-400.
28. Shiraki H., Ogawa H., Matsuda Y., Nakagawa H.: Interaction of rat muscle AMP deaminase with myosin. I. Biochemical study of the interaction of AMP deaminase and myosin in rat muscle. *Biochim.Biophys.Acta.* 1979,566,335-344.

29. Flanagan W. F., Holmes E. W., Sabina R. L., Swain J. L.: Importance of purine nucleotide cycle to energy production in skeletal muscle. *Am.J.Physiol.* 1986,251,C795-C802.
30. Hancock C. R., Brault J. J., Terjung R. L.: Protecting the cellular energy state during contractions: role of AMP deaminase. *J.Physiol Pharmacol.* 2006,57 Suppl 10,17-29.
31. Kushmerick M. J., Moerland T. S., Wiseman R. W.: Mammalian skeletal muscle fibers distinguished by contents of phosphocreatine, ATP, and Pi. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1992,89,7521-7525.
32. Lowenstein J. M. Ammonia production in muscle and other tissues: the purine nucleotide cycle. *Physiol Rev.* 1972,52,382-414.
33. Aragon J. J., Tornheim K., Lowenstein J. M.: On a possible role of IMP in the regulation of phosphorylase activity in skeletal muscle. *FEBS Lett.* 1980,117 Suppl:K56-64.
34. Tornheim K., Lowenstein J. M.: The purine nucleotide cycle. IV. Interactions with oscillations of the glycolytic pathway in muscle extracts. *J.Biol.Chem.* 1974,249,3241-3247.
35. Tornheim K., Lowenstein J. M. The purine nucleotide cycle. Control of phosphofructokinase and glycolytic oscillations in muscle extracts. *J.Biol.Chem.* 1975,250,6304-6314.
36. Van den Berghe G., Bontemps F., Vincent M. F., Van den Bergh F.: The purine nucleotide cycle and its molecular defects. *Prog.Neurobiol.* 1992,39,547-561.
37. Chung L., Bridger W. A.: Activation of rabbit cardiac AMP aminohydrolase by ADP: a component of a mechanism guarding against ATP depletion. *FEBS Lett.* 1976,64,338-340.
38. Purzycka-Preis J., Prus E., Wozniak M., Zydowo M.: Modification by liposomes of the adenosine triphosphate-activating effect on adenylate deaminase from pig heart. *Biochem J.* 1978,175,607-612.
39. Kaletha K., Skladanowski A.: Regulatory properties of rat heart AMP deaminase. *Biochim Biophys.Acta.* 1979,568,80-90.
40. Skladanowski A., Kaletha K., Zydowo M.: Potassium-dependent regulation by ATP and ADP of AMP-deaminase from beef heart. *Int.J.Biochem.* 1979,10,177-181.
41. Kaletha K., Skladanowski A., Bogdanowicz S., Zydowo M.: Purification and some regulatory properties of human heart adenylate deaminase. *Int.J.Biochem.* 1979,10,925-929.
42. Nowak G., Kaletha K.: Molecular forms of human heart muscle AMP deaminase. *Biochem.Med.Metab Biol.* 1991,46,263-266.

43. Mahnke-Zizelman D. K., D'cunha J, Wojnar J. M., Brogley M. A., Sabina R. L.: Regulation of rat AMP deaminase 3 (isoform C) by development and skeletal muscle fibre type. *Biochem J.* 1997,326,521-529.
44. Fishbein W. N., Armbrustmacher V. W., Griffin J. L.: Myoadenylate deaminase deficiency: a new disease of muscle. *Science* 1978,200,545-548.
45. Morisaki T., Gross M., Morisaki H., Pongratz D., Zollner N., Holmes E. W.: Molecular basis of AMP deaminase deficiency in skeletal muscle. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1992,89,6457-6461.
46. Norman B., Mahnke-Zizelman D. K., Vallis A., Sabina R. L.: Genetic and other determinants of AMP deaminase activity in healthy adult skeletal muscle. *J.Appl.Physiol.* 1998,85,1273-1278.
47. Verzijl H. T., van Engelen B. G., Luyten J. A., Steenbergen G. C., van den Heuvel L. P., ter Laak H. J., Padberg G. W., Wevers R. A.: Genetic characteristics of myoadenylate deaminase deficiency. *Ann.Neurol.* 1998,44,140-143.
48. Fishbein W. N.: Myoadenylate deaminase deficiency: primary and secondary types. *Toxicol.Ind.Health.* 1986,2,105-118.
49. Rotzer E., Mortier W., Reichmann H., Gross M.: The genetic basis of myoadenylate deaminase deficiency is heterogeneous. *Adv.Exp.Med.Biol.* 1998,431,129-133.
50. Gross M., Rotzer E., Kollé P., Mortier W., Reichmann H., Goebel H. H., Lochmüller H., Pongratz D., Mahnke-Zizelman D. K., and Sabina R. L.: A G468-T AMPD1 mutant allele contributes to the high incidence of myoadenylate deaminase deficiency in the Caucasian population. *Neuromuscul.Disord.* 2002,12,558-565.
51. Kaletha K., Nowak G.: Myoadenylate deaminase deficiency studies on normal and deaminase-deficient skeletal muscle. *Clin.Chim.Acta.* 1990,190,147-155.
52. Hochachka P. W., Mommsen T. P.: Protons and anaerobiosis. *Science* 1983 219,1391-1397.
53. Hellsten Y., Richter E. A., Kiens B., Bangsbo J.: AMP deamination and purine exchange in human skeletal muscle during and after intense exercise. *J.Physiol.* 1999,520,909-920.
54. Loh E., Rebbeck T. R., Mahoney P. D., DeNofrio D., Swain J. L., Holmes E. W.: Common variant in AMPD1 gene predicts improved clinical outcome in patients with heart failure. *Circulation* 1999,99,1422-1425.
55. Dougherty C., Barucha J., Schofield P. R., Jacobson K. A., Liang B. T.: Cardiac myocytes rendered ischemia resistant by expressing the human adenosine A1 or A3 receptor. *FASEB J.* 1998,12,1785-1792.
56. Rużyłło W., Rydlewska-Sadowska W., Wojtczak A.: Choroby Wewnętrzne t1. 1995,724-753, Wydawnictwo Lekarskie PZWL.

57. Anderson J. L., Habashi J., Carlquist J. F., Muhlestein J. B., Horne B. D., Bair T. L., Pearson R. R., Hart N.: A common variant of the AMPD1 gene predicts improved cardiovascular survival in patients with coronary artery disease. *J.Am.Coll.Cardiol.* 2000,36,1248-1252.
58. Yacoub M. H., Yuen A. H., Kalsi K. K., Birks E. J., Taegtmeyer A., Barton P. J., Johnson P. H., Suzuki K., Smolenski R. T.: C34T AMP deaminase 1 gene mutation protects cardiac function in donors. *Transplantation* 2004,77,1621-1623.
59. Ver Donck K.: Purine metabolism in the heart. Strategies for protection against myocardial ischaemia. *Pharm.World Sci.* 1994,16,69-76.
60. Hopkins T. A., Dyck J. R., Lopaschuk G. D.: AMP-activated protein kinase regulation of fatty acid oxidation in the ischaemic heart. *Biochem.Soc.Trans.* 2003,31,207-212.
61. Musi N., Yu H., Goodyear L. J.: AMP-activated protein kinase regulation and action in skeletal muscle during exercise. *Biochem.Soc.Trans.* 2003,31,191-195.
62. Peralta C., Bartrons R., Serafin A., Blazquez C., Guzman M., Prats N., Xaus C., Cutillas B., Gelpi E., Rosello-Catafau J.: Adenosine monophosphate-activated protein kinase mediates the protective effects of ischemic preconditioning on hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *Hepatology* 2001,34,1164-1173.
63. Kaletha K.: Changes of the heat sensibility of AMP-deaminase from rat skeletal muscle in the course of postnatal development. *Int.J.Biochem.* 1975,6, 471-474.
64. Kaletha K., Spychala J., Nowak G.: Developmental forms of human skeletal muscle AMP-deaminase. *Experientia* 1987,43,440-443.
65. Kaletha K., Nowak G.: Developmental forms of human skeletal-muscle AMP deaminase. The kinetic and regulatory properties of the enzyme. *Biochem J.* 1988,249,255-261.
66. Marquetant R., Desai N. M., Sabina R. L., Holmes E. W.: Evidence for sequential expression of multiple AMP deaminase isoforms during skeletal muscle development. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1987,84,2345-2349.
67. Raggi A., Bergamini C., Ronca G.: Isozymes of AMP deaminase in red and white skeletal muscles. *FEBS Lett.* 1975,58,19-23.
68. Morisaki H., Morisaki T., Newby L. K., Holmes E. W.: Alternative splicing: a mechanism for phenotypic rescue of a common inherited defect. *J.Clin.Invest.* 1993,91,2275-2280.
69. Sabina R. L., Ogasawara N., Holmes E. W.: Expression of three stage-specific transcripts of AMP deaminase during myogenesis. *Mol.Cell Biol.* 1989,9,2244-2246.

70. Mahnke-Zizelman D. K., Van den Bergh F., Bausch-Jurken M. T., Eddy R., Sait S., Shows T. B., Sabina R. L.: Cloning, sequence and characterization of the human AMPD2 gene: evidence for transcriptional regulation by two closely spaced promoters. *Biochim Biophys. Acta.* 1996,1308,122-132.
71. Mahnke-Zizelman D. K., Tullson P. C., Sabina R. L.: 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.* 1998,273,35118-35125.
72. Koretz J. F., Frieden C.: Adenylate deaminase binding to synthetic thick filaments of myosin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 1980,77,7186-7188.
73. Cooper J., Trinick J.: Binding and location of AMP deaminase in rabbit psoas muscle myofibrils. *J. Mol. Biol.* 1984,177,137-152.
74. Barshop B. A., Frieden C.: Analysis of the interaction of rabbit skeletal muscle adenylate deaminase with myosin subfragments. A kinetically regulated system. *J. Biol. Chem.* 1984,259,60-66.
75. Ogasawara N., Goto H., Yamada Y., Watanabe T.: Distribution of AMP-deaminase isozymes in rat tissues. *Eur. J. Biochem.* 1978,87,297-304.
76. Chaney A. L., Marbach E. P.: Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clin. Chem.* 1962,8,130-132.
77. Solano C., Coffee C. J.: Differential response of AMP deaminase isozymes to changes in the adenylate energy charge. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1978,85,564-571.
78. Sabina R. L., Fishbein W. N., Pezeshkpour G., Clarke P. R., Holmes E. W.: Molecular analysis of the myoadenylate deaminase deficiencies. *Neurology* 1992,42,170-179.
79. Van den Bergh F., Sabina R. L. Characterization of human AMP deaminase 2 (AMPD2) gene expression reveals alternative transcripts encoding variable N-terminal extensions of isoform L. *Biochem J.* 1995,312,401-410.
80. DiMauro S., Hirano M.: Mitochondria and heart disease. *Curr. Opin. Cardiol.* 1998,13,190-197.
81. Kochan Z., Smolenski R. T., Yacoub M. H., Seymour A. L.: Nucleotide and adenosine metabolism in different cell types of human and rat heart. *J. Mol. Cell Cardiol.* 1994,26,1497-1503.
82. Zydowo M.: Biochemistry of the heart. *Pol. Tyg. Lek.* 1970,25,1426-1429.
83. Ingwall J. S.: Is creatine kinase a target for AMP-activated protein kinase in the heart? *J. Mol. Cell Cardiol.* 2002,34,1111-1120.
84. Żydowo M.: Adenine compounds and the heart. *Int. J. Biochem.* 1976,7, 353-357.

85. Bianchi V., Spsychala J.: Mammalian 5'-nucleotidases. *J.Biol.Chem.* 2003,278,46195-46198.
86. Borowiec A., Lechward K., Tkacz-Stachowska K., Skladanowski A. C.: Adenosine as a metabolic regulator of tissue function: production of adenosine by cytoplasmic 5'-nucleotidases. *Acta Biochim. Pol.* 2006,53,269-278.
87. Zimmermann H.: 5'-Nucleotidase: molecular structure and functional aspects. *Biochem. J.* 1992,285,345-365.
88. Spsychala 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.
89. Itoh R., Oka J., Ozasa H.: Regulation of rat heart cytosol 5'-nucleotidase by adenylate energy charge. *Biochem. J.* 1986,235,847-851.
90. Itoh R., Yamada K.: Determination of cytoplasmic 5'-nucleotidase which preferentially hydrolyses 6-hydroxypurine nucleotides in pig, rat and human tissues by immunotitration. *Int.J.Biochem.* 1991,23,461-465.
91. Truong V. L., Collinson A. R., Lowenstein J. M.: 5'-Nucleotidases in rat heart. Evidence for the occurrence of two soluble enzymes with different substrate specificities. *Biochem. J.* 1988,253:117-121.
92. Newby A. C., Holmquist C. A., Illingworth J., Pearson J. D.: The control of adenosine concentration in polymorphonuclear leucocytes, cultured heart cells and isolated perfused heart from the rat. *Biochem. J.* 1983,214,317-323.
93. Skladanowski A. C., Newby A. C.: Partial purification and properties of an AMP-specific soluble 5'-nucleotidase from pigeon heart. *Biochem. J.* 1990,268,117-122.
94. Van Belle H., Wynants J., Goossens F.: Formation and release of nucleosides in the ischemic myocardium. Is the guinea-pig the exception? *Basic Res.Cardiol.* 1985,80,653-660.
95. Smolenski R. T., Sutters A., Yacoub M. H.: Adenine nucleotide catabolism and adenosine formation in isolated human cardiomyocytes. *J.Mol.Cell Cardiol.* 1992,24,91-96.
96. Kalsi K. K., Yuen A. H., Rybakowska I. M., Johnson P. H., Slominska E., Birks E. J., Kaletha K., Yacoub M. H., Smolenski R. T.: Decreased cardiac activity of AMP deaminase in subjects with the AMPD1 mutation-a potential mechanism of protection in heart failure. *Cardiovasc.Res.* 2003,59,678-684.
97. Rybakowska I., Nagel-Starczynowska G., Słomińska E., Chodorowski Z., Smolenski R., Kaletha K.: AMP-deaminaza jako cel oddziaływań farmakologicznych w prewencji chorób serca. *Kardiologia Polska* 2006,59, suplement II, 87-9.

