B 1865

A PATKÁNYLÉP CITOPLAZMÁBÓL RÉSZLEGESEN TISZTITOTT TIMIDINKINÁZ ENZIM TULAJDONSÁGAIRÓL

Doktori dolgozat

irta:

Kulinyi Gábor

MTA

Szegedi Biológiai Központ

Biokémiai Intézet

SZEGED

1980

Röviditések jegyzéke

ATP	adenozin-trifoszfát
Cpm	radioaktiv beütés/perc
dCDP	dezoxicitidin-difoszfát
dCTP	dezoxicitidin-trifoszfát
DEAE	dietil-aminoetán
DNS	dezoxiribonukleinsav
dTMP	dezoxitimidin-monofoszfát
dUMP	dezoxiuridin-monofoszfát
E.coli	Escherichia coli
NDP	nukleozid-difoszfát
NTP	nukleozid-trifoszfát
PEG	polietilén-glikol
RPM	fordulat/perc
SPF	specifikus patogén mentes
dTTP	dezoxitimidin-trifoszfát
tris	trisz(hidroximetil)aminometán
UV	ultraibolya

József Attila Tudományegyetem Könyvtára SZEGED

Tartalomjegyzék

Irodalmi összefoglaló..... 1 oldal

A kisérletes munka célkitüzése..... 9 "

Anyagok és módszerek..... 11 "

Eredmények és következtetések..... 15 "

1. A timidinkináz enzim tisztitása..... 15 "

2. A preparátum tisztasága és stabilitása..... 19 "

3. A timidinkináz enzim kinetikai vizsgálata..... 23 "

4. A timidinkináz enzim hiszteretikus alloszterikus tulajdonságainak vizsgálata..... 38 "

Összefoglaló..... 45 "

Irodalomjegyzék..... 48 "

Irodalmi összefoglaló

A dezoxitimidin-5'-foszfát állati szervezetek sejtjeiben elvileg két különböző uton keletkezhet. Az egyik lehetőség az, hogy az állati szervezetben a DNS lebontás során keletkező dezoxitimidin ATP segitségével foszforilálódik. Ez a timidinkináz - ATP: dezoxitimidin -5'-foszfotranszferáz, EC 2.7.1.75 - által katalizált reakció a következő általános egyenlettel irható le:

dezoxitimidin + NTP --dTMP + NDP (1)

A dTMP keletkezésének másik lehetősége az ugynevezett de novo szintézis, melynek során dUMP-ből metilezés révén dTMP keletkezik. Ez utóbbi de novo képződési reakciót a timidilát szintetáz (EC 2.1.1.45.) katalizálja, és az alábbi reakcióegyenlettel irható le:

dUMP + N^5, N^{10} - metiléntetrahidrofolsav ---

--- dTMP + dihidrofolsav (2)

A dezoxiribonukleotidok pool-ja lényegében a DNS iniciációjával egyidőben növekszik meg (1) a nukleotidok szintézisében szerepet játszó enzimek szintjének és aktivitásának fokozódása révén. A timidinkináz enzim aktivitásának vagy szintjének különösen feltünő növekedése ugyanugy bizonyitja fontos szerepét a dTTP képzésében, mint a dTTP-re való feed back szenzitivitása (2). Az irodalmi adatokból nem lehet biztosan tudni, hogy az enzim aktivitásának fokozódását a már megszintetizálódott enzim

alloszterikus aktiválása, vagy az enzim mennyiségének a növekedése okozza-e. A timidilát-szintetáz enzimnél hasonló szoros összefüggést a sejt ciklusával nem sikerült kimutatni. Ezekből az irodalmi adatokból valószínünek látszott, hogy az enzim tulajdonságainak vizsgálata értékes adatokat nyujthat mindazokról a mechanizmusokról, amelyek az enzim katalitikus aktivitását befolyásolhatják, és ezen keresztül a dTTP, illetve a DNS szintézis szabályozásáról is gondoskodnak.

A timidinkinázt Escherichia coli-ból (3), Bacillus stearothermophilus-ból (4), több emlős tumorból (5,6,7,8,9), regenerálódó patkánymájból (10,11) borju thymusból (12) tisztitották. A tisztitások során az alábbi lépéseket alkalmazták:

$/NH_4/_2SO_4$-os kicsapás	(3,4,5,6,7,9,10,11,12)
Hőkezelés	(3,4,5,10)
Streptomycin szulfátos kicsapás	(3,4,6,7,8,9,12)
DEAE cellulóz, vagy Sephadex kromatográfia	(3,4,6,7,10,11)
Gélszürés	(6,7,12)
Pozitiv vagy negativ $Ca_3/PO_4/_2$ adszorpció	(5,10)
Protaminos kicsapás	(12)
Hidroxiapatit kromatográfia	(6)
Cellulóz-foszfát kromatográfia	(4)

József Attila Tudományegyetem Könyvtára SZEGED

Affinitás kromatográfia (8,9)

Az enzim aktivitását ^{3}H vagy ^{14}C timidinnel mérik, a szubsztrát és a foszforilálttermék elektroforetikus, vagy anion cserélő cellulózon történő elválasztása alapján.

Szubsztrát specifitás:

A bakteriális és az emlős szervekből tisztitott enzimek specifikusan foszforilálják a dezoxitimidint, a dezoxiuridint és ennek 5-ös helyzetben szubsztituált származékait halogénezett származékok (2,5,6,3), 5'-merkapto-2'-dezoxiuridint (13), 5-trifluorometil-2'--dezoxiuridint (14), amelyek kompetitiv gátlói az enzimnek.

Foszfát donorok:

A katalitikus reakció során a dTTP-ot kivéve bármelyik ribonukleozid-trifoszfát alkalmas foszfát donornak. Néhány rendszerből tisztitott enzim csak az ATP-vel és a dATP-vel képes foszforilálni (7,11,15).

Kinetikai sajátosságok:

A dezoxitimidin-kináz pH optimuma 7 és 8,5 között van (3,5,6,8,9,10,15). Az enzimreakcióhoz szükséges Mg^{2+} -ot részben helyettesitheti Mn^{2+} és Co^{2+} (11). Mg^{2+} jelenlétében a Fe^{2+} és Zn^{2+} erős inhibitorok (5,6). Az E. coliból tisztitott enzim maximális aktivitása Mg^{2+} és Mn^{2+} jelenlétében volt mérhető (3).

A dTTP alloszterikus gátló hatását minden eddig vizsgált esetben kimutatták. Okazaki és Kornberg (3) tanulmányozta először az E. coliból tisztitott enzimen a dTTP-nek mint alloszterikus effektornak a hatását. Ők mutatták ki azt is, hogy az enzimre nemcsak a dTTP gátló hatása, hanem több nukleozid di- és trifoszfát aktiváló hatása is jellemző. Ezek a nukleotidok alacsony dTTP szint esetén felszaporodtak a sejtekben. Az aktivátorok csökkentik az enzim K_M-jét a dezoxitimidinnel szemben. Az enzim csak viszonylag magas ATP-koncentrációnál telitődött, s a telitési görbe szigmoidális volt hiperbolikus helyett. Ebből arra következtettek, hogy az enzimnek két ATP-kötő helye van két különböző funkcióval. Az egyiken az ATP mint alloszterikus effektor aktiválja az enzimmolekulát, a másikon pedig mint foszfát donor vesz részt a reakcióban. A dCDP bizonyult a legjobb alloszterikus aktivátornak, melynek jelenlétében az ATP telitési görbe szabályos, hiperbolikus volt. A feedback inhibitor dTTP kompetitiv gátlást ad a foszfát akceptorral, a dezoxitimidinnel, de nem kompetál a foszfát donorral vagy az aktivátor nukleotiddal (3).

Mások az E. coliból izolált enzim vizsgálata során szacharóz sürüségi grádienst és gélszürést alkalmaztak az alloszterikus effektorok hatásának kimutatására. Mind a negativ (dTTP), mind a pozitiv effektorok (dCDP, dCTP)

hozzáadására a szedimentációs állandó megnőtt, illetve az enzimmolekula sulya megkétszerződött. A monomer és dimer molekulasulya 42000 és 90000 körüli. A szedimentációs koefficiens 3,4 S-ről 5,4 S-re növekedett az aktivátor hozzáadására és majdnem 6,0-ra dTTP jelenlétében. A szedimentációs koefficiens ezen kis különbségei a dimér forma konformációs változásait mutatják az aktivátor, illetve az inhibitor jelenlétében (16).

Az enzim monomer alakja igen érzékenynek bizonyult a hőmérséklet emelésére. A legnagyobb reakciósebességet 28 ^{o}C-on lehetett mérni. Magasabb hőmérsékleten a reakciósebesség kisebbnek mutatkozott, ami inkább az enzim kisebb affinitását mutatja a szubsztrátokhoz, mint az enzim inaktivációját, annál is inkább, mivel a hőmérséklet hatása reverzibilis volt (a K_M érték a dT-re egy nagyságrenddel magasabb 37 ^{o}C-on mint 21 ^{o}C-on). Az alloszterikus effektorok jelenlétében a reakciósebességi optimumok magasabb hőmérsékleti érték felé tolódtak el (17).

Az Escherichia coli enzimre leirt összes jelenségeket nem sikerült még más rendszerben megfigyelni. A borju thymusból preparált enzim gátlása dTTP-vel kompetitivnek bizonyult a foszfát akceptorral szemben, mig a donorral szemben non-kompetitiv volt alacsony ATP-koncentrációnál, viszont magas ATP-koncentrációnál kompetitiv jelleget mu-

Attila Tudományegyetem Könyvtára SZEGED

tatott. Ennél az enzimnél nem tudtak kimutatni aktivátor hatásu nukleotidot (12). Állati tumorokból nyert enzimeken szintén nem lehetett kimutatni a dCTP aktiváló hatását (5).

Regenerálódó patkánymájból tisztitott enzimmel végzett kisérletekben a dTTP non-kompetitiv gátlószernek bizonyult a foszfát donorral szemben (10), mig kompetitiv gátlást mutatott a timidinnel szemben (11).

A timidinkinázok molekulasulya több emlős tumorból az aggregáció mértékétől függően 100000 és 600000 között változott (5). A különböző molekulasulyu, illetve elektroforetikus mobilitásu formákat több forrásból izolált enzimnél leirták. Embrionális és felnőtt emberi szövetekben az elektroforetikus mobilitás a kor növekedésével nőtt. Ezek a különböző enzimformák különböző kinetikai tulajdonságokkal is rendelkeznek (15).

A kulturában tartott patkányvese sejtekben a mitotikus index növekedésével a sejtekben lévő timidinkinázok elektroforetikus mobilitása a kisebb értékek felé tolódott el. A szövet növekvő korával a sejtjeiben található timidinkinázok elektroforetikus mobilitása viszont a nagyobb értékek felé tolódott (18).

A regenerálódó patkánymájból DEAE cellulóz kromatográfiával két izoenzimet lehetett elválasztani. Az alacsonyabb sókoncentrációval eluálható enzim a regenerá-

ciós folyamat során jelent meg (11). A magas sókoncentrációval eluálható izoenzimet a mitokondriális enzimmel azonositották, mig a másik enzimet a citoplazmatikussal.

A humán akut mieloid leukémiás sejtekben a nagyobb elektroforetikus mobilitásu enzimet a mitokondriális izoenzimmel, mig a kisebb mobilitásut a citoplazmatikussal azonositották (20).

Fitohemagglutininnal stimulált humán limfocitákból DEAE Sephadex oszlopon két enzimformát sikerült elválasztani. A nem stimulált limfocitákban csak a magasabb sókoncentrációval eluálható enzimforma volt jelen. A stimulált és a nem-stimulált sejtekből az azonos eluálhatóságu enzimformák hasonló kinetikai tulajdonságokkal is rendelkeztek, mig az az enzimforma, amely kizárólag a stimulált sejtekben volt jelen, az előzőektől eltérő kinetikai paraméterekkel rendelkezett: magasabb K_M érték, kisebb érzékenység a feed back gátló dTTP-vel szemben.

Stabilitás:

A különböző rendszerekből tisztitott enzimek érzékenynek bizonyultak a magasabb hőmérsékletre, illetve szulfhidril-reagensekkel szemben. A hőmérséklet okozta inaktivációt a szubsztrátok, illetve az enzim inhibitorai kivédték (5,12). A szulfhidril reagensek erősen gá-

tolták az enzimet (5,6). Az SH-vegyület csoportot tartalmazó reagens jelenléte esszenciális a humán leukémiás sejtekből tisztitható enzimnél. Az egér aszcitesz S-180-ból tisztitható enzim viszont nagyban károsodott 37 ^{o}C-on inkubálva merkapto-etanol jelenlétében (7).

Az enzimreakció mechanizmusa:

Az enzimreakció kezdeti sebességéből szekvenciális tipusu reakcióra következtetnek a borju thymusból nyerhető enzim esetében (12). A szubsztrátok és a termékek közötti gátlási tipusok alapján a humán leukémiás sejtek citoplazmájából tisztitható enzimre a szekvenciális tipust, mig a mitokondriális enzimre a ping-pong-tipusu reakciómechanizmust valószinüsitik (20).

A kisérletes munka célkitüzése

Ahogy a bevezetőből kitünik, a timidinkinázról szerzett ismeretek alapjául főként bakteriális, valamint patológiás emlős szövetekből származó enzimek szolgáltak. Kevés adat van a normál, de intenziven osztódó emlős sejtekben és szövetekben levő timidinkinázokról. A normál, fiziológiás körülmények között lejátszódó intenziv DNS-szintézis ismeretéhez pedig ez jelentős lenne a molekuláris szintü mechanizmusok megértéséhez.

A lépet azért választottuk forrásul, mert más szempontból is vizsgáltuk az immun-rendszer differenciációs, proliferációs folyamatait. A patkánylépet pedig azért, mert a megfelelő korban jó feltételeket biztosit nagyobb mennyiségü enzim kinyerésére.

Célunk volt:

1. Az enzim tisztitása legalább olyan fokig, ahol már nincsenek jelen más, szóba jöhető enzimek, amelyek az enzimaktivitás mérését zavarhatnák.
2. A tisztitott enzim kinetikai paramétereinek meghatározása.
3. Az enzim kapott tulajdonságai alapján:
   a./ egy lehetséges magyarázat adása az irodalomban az enzimre leirt tulajdonságokra, illetve ezek fiziológiás szerepére.

b./ olyan módszer keresése, amellyel az enzim továbbtisztitása megoldható lenne.

Anyagok és módszerek:

Kisérleteinkhez az Intézetünk állatházából származó beltenyésztett, specifikus kórokozó mentes PVG/c jelü patkánytörzs 30 ± 5 napos egyedeit használtuk.

A timidint, a TTP-t, a Ponceau-S festéket, a Protamin szulfátot és a Trist (Trizma) a Sigma Chemical Company-től, a 2-^{14}C timidint az UVVVR-től (Prága), az ammóniumszulfátot a BDH Chemicals Ltd-től, a DEAE cellulóz papirt (DE-81) a Whatmann-tól, a folyadék szcintillátort "Scintol-7" a Koch Light Laboratories Ltd. cégtől szereztük be. A Na-citrát és a citromsav a Merck gyár terméke, a cellulózacetát membránt a Gelman Instruments gyártól, az összes többi felhasznált anyagot analitikai minőségben a Reanal gyártól szereztük be.

A timidinkináz enzim mérését Breitman szerint végeztük (21) néhány változtatással. A reakcióelegy a következő anyagokat tartalmazta: 10 mM tris-HCl pH 8,0; 5 mM ATP; 2,5 mM $MgCl_2$; 30 µM (2-^{14}C) timidin, specifikus aktivitása: 15 cpm/pmole.

A reakcióelegyet 5 percig előinkubáltuk a mérésnek megfelelő hőmérsékleten, majd az enzim hozzáadásával inditottuk a reakciót. A megfelelő időpontokban 50 µl-es mintákat szivattunk rá, a 2,3 cm átmérőjü DE-81-es papirkorongokra, amelyeket ezután 300 ml olvadó jég hőmérsékletü 1 mM-os ammóniumformiát oldatba dobtunk (legalább

5 ml 1 mM-os ammoniumformiát/korong . A korongokat háromszor 10 percig mostuk 300 ml 1 mM-os ammoniumformiátban, majd 10 percig 300 ml desztillált vizben, végül 10 percig 100 ml 96%-os etanolban. Ilyen körülmények között csak a dT eluálódik a DE-81-es papirról, mig a foszforilált származékok továbbra is a papirhoz kötve maradnak. A korongokat infravörös lámpa alatt megszáritottuk, majd 10 ml toluol alapu szcintillációs folyadékot tartalmazó küvettákba tettük. A radioaktivitás mérését Nuclear Chicago Isocap-300-as tipusu folyadékszcintillációs számlálón végeztük. Az ATP, illetve az enzim hozzáadása nélkül mért kontrollok a bevitt izotóp aktivitásának legfeljebb 1%-át tartalmazták. A bemért összaktivitáson a mosás nélküli kontroll aktivitását értjük. Az enzimek egy egysége az a mennyiség, amely egy perc alatt µl mol dTMP képződését katalizálja.

A fehérjekoncentrációt Lowry és munkatársai (22) módszerével határoztuk meg marhaszérum albumint használva standardként.

Az állatokat éteres altatásban, szivpunctióval véreztettük el. Az állatokból kivett szerveket olvadó jég hőmérsékletü fiziológiás sóoldatban (0,9% NaCl) gyüjtöttük, majd a lehető leggyorsabban feldolgoztuk.

Az ATPáz aktivitást Reimann és Umfleet (23) szerint mértük, amely a képződő anorganikus foszfát mennyiségének meghatározásán alapul.

A reakcióelegyben lévő nukleotidok vizsgálatát papir-elektroforézissel Kornberg szerint (3) végeztük. A mintát, amely nukleotidonként kb. 30 µg anyagot tartalmazott, Whatmann 3 MM jelzésü papirra vittük fel. A papirt előzőleg az 50 mM-os citromsav-nátriumcitrát tankpufferben megnedvesitettük. A futtatás körülményei: feszültség 23 V/cm-papir; áramerősség 4-8 mA/papir; a futtatás ideje 50 perc. Az áramforrás a Gelman gyár terméke. A futtatás után a papirt megszáritottuk, az elválasztott nukleotidokat UV-lámpa alatt tettük láthatóvá, és standardok segitségével azonositottuk.

A preparátumban lévő fehérjék elválasztását cellulózacetát-membránelektroforézissel végeztük. A fehérje mintát, amely általában 200 µg fehérjét tartalmazott, egy 2,5-ször 17,1 cm-es méretü cellulózacetát-membránra vittük fel. A membránt előzőleg a 65 mM-os Tris-borát pH 9,0-es tankpufferben áztattuk. A mintát negyven percig futtattuk 300 V feszültség mellett, az áramerősség 2 mA/ /csik volt. A futtatás után 10 percig festettük a mintákat Ponceau-S festékben(500 mg 100 ml 5%-os TCA-ban), majd a differenciálást 7%-os ecetsavval végeztük.

Az elektroforézis után a timidinkináz aktivitását egy általunk kidolgozott módszerrel mértük. DE-81-es papirból 6 x 2,5 cm-es csikot vágtunk ki, melyet egy üveglapra helyeztünk. A papirt ezután reakcióeleggyel átitat-

tuk (28 µl reakcióelegy/cm^2). A cellulózacetát-membránt pontosan ráhelyeztük a DE-81-es papirra, majd egy másik üveglappal lefedtük. Az igy kapott "szendvicset" megforditottuk és 40 ^oC-on 30 percig inkubáltuk. Az inkubálás után a DE-81-es papirt ugyanugy mostuk, mint a DE--81-es korongokat a timidinkináz enzim aktivitásának mérésekor. Száritás után a DE-81-es papirt 3 mm-es csikokra vágtuk, és radioaktivitását hasonló körülmények között mértük, mint a timidinkináz mérésekor. Ilyen mérési körülmények között az elektroforézisre felvitt minta mennyisége és a képződött dTMP mennyisége között egyenes arányosság volt.

Eredmények és következtetések

A timidinkináz enzim tisztitása patkánylép citoplazmából

A timidinkináz enzim tisztitása előtt meg kellett állapitani, hogy a patkányoknál melyik az a kor, amikor a lép nagysága és az enzim magas szintje optimális feltételeket biztosit az enzim tisztitásához. Ezek a feltételek a 25-35 napos állatoknál teljesülnek, mivel ebben a korban az állatok lépe már elég nagy, kb. 300 mg-os, és még az enzim szintje elég magas (I. Táblázat).

A timidinkináz enzim tisztitására leirt több módszert próbáltunk alkalmazni. Megpróbáltuk reprodukálni a Hashimoto és munkatársai (6) által a Yoshida-szarkomából kiinduló tisztitást. A preparálás végére azonban a specifikus aktivitás a kiindulásihoz képest 1/3 részére csökkent. Az enzimtisztitásra a következő módszereket próbáltuk ki: hidroxiapatit, DEAE cellulóz, Sephadex-G--100, Biogél P-300 kromatográfiák, $Ca_3/PO_4/_2$ gél-adszorpció, preparativ gélelektroforézis. Ezek a módszerek sajnos az enzim inaktiválódását okozták. Ezek az eljárások részben más emlős szervből kiinduló tisztitás esetében is sikertelennek bizonyultak (M.O. Her és munkatársai) (12).

József Attila Tudományegyetem Könyvtára SZEGED

I. Táblázat

A PVG/c patkányok lépsulyának és a lép citoplazmatikus timidinkináz specifikus aktivitásának változása a kor függvényében. A specifikus aktivitások középértékét tüntettük fel ± a standard eltérés 3 párhuzamos esetében.

kor napokban	a lép sulya (mg)		a timidinkináz specifikus aktivitása (μmol/mg perc) x 10^3	
	nőstény	him	nőstény	him
10	90	95	0.85±0.15	0.80±0.20
20	100	105	0.45±0.17	0.45±0.18
25	150	200	0.85±0.14	0.70±0.20
30	225	260	0.65±0.19	0.70±0.16
35	270	325	0.50±0.12	0.50±0.15
40	300	370	0.35±0.10	0.45±0.10
45	325	410	0.20±0.07	0.25±0.11
55	345	460	0.05±0.02	0.15±0.05
70	360	525	0.04±0.01	0.10±0.05

Patkánylép citoplazmából a timidinkináz enzim tisztitására a következő módszert sikerült kidolgoznunk.

A frissen kivett lépeket g-ban kifejezett sulyuknak 3-szoros térfogatában (ml) homogenizáltuk 1000 RPM-el 10 fel-lehuzással Braun-Potter S készülékkel. A tisztitás kezdetétől a preparátum hőmérséklete nem emelkedett 4 ^{o}C fölé. A homogenizáló puffer összetétele a következő volt: 0,25 M szacharóz; 50 mM tris-HCl pH 7,5; 3,3 mM $CaCl_2$. A homogenizátumot 10 percig 800 g-vel centrifugáltuk, igy a sejtmagokat különitettük el, melyet más kisérletekben használtunk fel. A felüluszót 60 percig 105000 g-vel centrifugáltuk, igy a mitokondrium és a mikroszóma frakciót különitettük el a citoplazmától. A 105000 g-s felüluszót minusz 30 ^{o}C-on tároltuk a tisztitás kezdetéig.

Protamin-szulfátos kicsapás

0,1 térfogat 1%-os protamin-szulfát oldatot, pH 5,5 adtunk a 105000 g felüluszóhoz. A hozzáadás után 15 percig kevertettük. A képződött csapadékot 20 perces centrifugálással ülepitettük ki 17000 g-vel. Ezzel a módszerrel a nukleinsavakat távolitottuk el. Mivel a specifikus aktivitás nem változott, ezt a lépést a II. Táblázatban nem tüntettük fel.

Ammonium-szulfátos kicsapás

A protamin-szulfátos felüluszó minden milliliteréhez 0,26 g ammonium-szulfátot adtunk kevertetés közben. További 15 perc kevertetés után ugyanugy centrifugáltuk, mint az előző kicsapásnál. A kiülepedett csapadékot a kiindulási térfogat 1/10-nek megfelelő mennyiségü, 0,1 M KCl; 50 mM tris-HCl pH 7,5 standard pufferben oldottuk fel.

Hőkezelés

A feloldott ammonium-szulfátos csapadékhoz annyi 0,1 M-os timidint adtunk, hogy végkoncentrációja 1 mM legyen. Ezt a frakciót ezután 60 ^{o}C-os vizfürdőben tartottuk állandó keverés mellett 5 percig. A 4 ^{o}C-ra való gyors visszahütés után a denaturálódott fehérjéket kicentrifugáltuk az előbbi körülmények között. A csapadékot kis mennyiségü standard pufferrel mostuk, és centrifugáltuk, mint előbb. A két felüluszót összeöntöttük. A jelenlévő nagymennyiségü timidin miatt az enzim aktivitását nem tudtuk az előbbiekkel összevethetően mérni. A lépés hatékonyságát bizonyitja, hogy elhagyása esetén a II. ammonium-szulfátos kicsapás látszólag kevésbé lesz hatékony.

SZEGED

Második ammonium-szulfátos kicsapás

A fehérjéket az első ammonium-szulfátos kicsapással egyező körülmények között kicsaptuk, centrifugáltuk, majd a kiindulási térfogat 1/70-e térfogatu standard pufferben oldottuk fel. A preparátumot ezután 3 x 1 órán át dializáltuk 500-szoros térfogatu standard pufferben.

Polietilén-glikolos frakcionálás

A dializált frakció minden milliliteréhez 0.15 g 6000-es molekulasulyu PEG-t adtunk. A PEG feloldódása után még 15 percig kevertettük ezt a frakciót, majd centrifugáltuk az előző lépésben leirt módon. A kiülepitett csapadékot a lehető legkisebb térfogatu standard pufferben oldottuk fel. A fel nem oldódó anyagot ismételt centrifugálással távolitottuk el. A felüluszót, melynek fehérje-koncentrációja általában 15 mg/ml körül volt, kis részletekre osztottuk szét, majd minusz 30 ^{o}C-ra hütöttük le Eppendorf reakciócsövekben.

A kisérleteket igy csak egyszer felolvasztott preparátumokkal végezhettük.

A preparátum tisztasága és stabilitása, a kisérletek reprodukálhatósága

A tisztitás lépéseinek jellemző adatait a II. Táblázatban foglaltuk össze. A kidolgozott tisztitási eljá-

II. Táblázat

A PVG/c patkánylép citoplazmatikus timidinkinázának tisztítását jellemző adatok. 23 g lépből indultunk ki.

lépések	térfogat (ml)	fehérje (mg)	össz-aktivitás (μmol/perc) ($\times 10^3$)	specifikus aktivitás (μmol/mg perc) ($\times 10^3$)
105000 g felülúszó	60	818	812	0.99
1. $/NH_4/_2SO_4$-os kicsapás	6	123	906	7.37
2. $/NH_4/_2SO_4$-os kicsapás, dializálás	3	40	550	13.75
polietilén-glikolos kicsapás	1.2	18	480	26.67

rással a timidinkináz enzimet patkánylép citiplazmából átlagosan 25-szörösére sikerült tisztitani. Ez a szám azonban önmagában nem sokat árul el a preparátum tisztaságáról. Összevetve a mi preparátumunk specifikus aktivitását más, az irodalomban leirt preparátumokéival, azt mondhatjuk, hogy egy közepes szintet sikerült elérnünk. Ez azzal magyarázható, hogy a kiindulási specifikus aktivitás a mi esetünkben magasabb, mint a más szervekből kiinduló tisztitások esetében. A mi preparátumunk specifikus aktivitása például 3,6-szer nagyobb, mint a borju thymusból kiinduló preparálás során (12) 133-szorosra tisztitott preparátumé.

Mivel az enzimet nem sikerült megközelitően homogenitásig tisztitani, szükségét éreztük annak, hogy megmérjük, van-e a timidinkináz enzim aktivitásának mérését zavaró enzim a tisztitott preparátumokban. Ezért a következő kisérleteket végeztük el.

Preparátumunk ATPáz aktivitását a timidinkináz enzim aktivitása mérésének körülményei között mértük, azzal a különbséggel, hogy nem adtunk a rendszerhez timidint. A kapott eredményekből arra következtettünk, hogy rendszerünk nem tartalmaz zavaró mennyiségü ATPáz aktivitást, mivel a reakcióelegyben lévő ATP-nek mindössze 0,06 %-a bomlott el 1 perc alatt.

Megvizsgáltuk azt is, hogy a katalitikus reakcióban keletkező dTMP-ot valamilyen szennyező enzim elbontja-e

vagy esetleg tovább-foszforilálásával egy olyan termék képződik, amely a timidinkináz enzim aktivitását befolyásolja. Ennek eldöntésére termékanalizist végeztünk. Magas, 1 mg/ml-es fehérjekoncentrációju reakcióelegyet inkubáltunk 40 °C-on 6 percig. Azt az eredményt kaptuk, hogy a dezoxitimidin 91%-a foszforilálódik. Ez nem képzelhető el abban az esetben, ha a rendszerben dezoxitimidin-monofoszfátot bontó enzim aktivitás is jelen van. Annak eldöntésére, hogy a reakcióelegyben van-e a dTMP-n kivül más foszforilezett dT származék (dTDP, dTTP), az előbbi reakcióelegyből vett mintát elektroforetikus vizsgálatnak vetettük alá (3). A kisérletből megállapitottuk, hogy a felvitt mintának 96 %-a dTMP és 4,0 %-a dT, ha a felvitt össz-radioaktivitás százalékában fejezzük ki. A dTDP és dTTP mennyisége a mérés kimutatási határa alatt volt. A preparátumunkban tehát nincs a timidinkináz enzim aktivitását meghamisitó, zavaró szennyezés.

A minusz 30 °C-on tárolt tisztitott preparátum több hónapon keresztül megőrizte eredeti aktivitását, a kisérletek reprodukálhatók voltak, a tárolási időtől függetlenül. A következőkben leirt kisérleteket többször megismételtük, és minden kisérletet 3 párhuzamossal végeztünk.

A timidinkináz enzim kinetikai vizsgálata

pH optimum

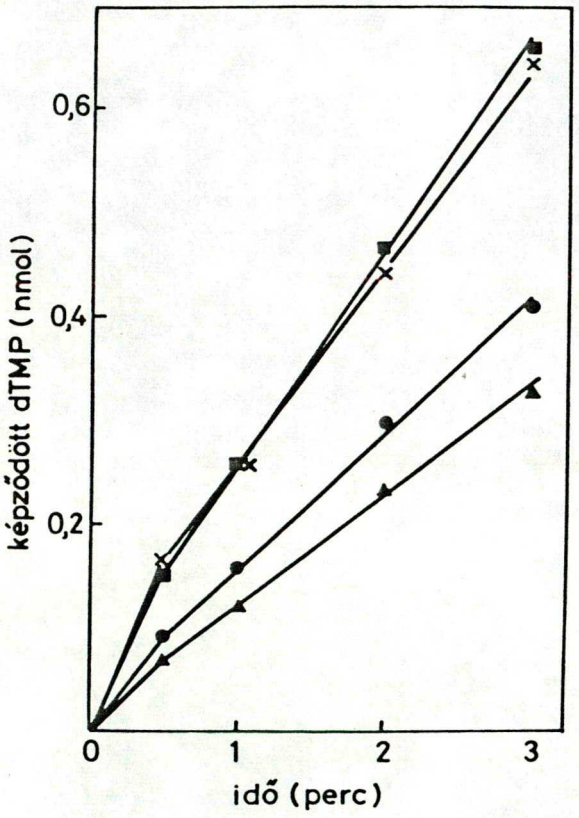
Az enzimreakció pH optimuma tris-HCl pufferben - irodalmi adatokkal összhangban - pH 8,0.

Az ATP, Mg^{2+} arány hatása az enzim aktivitására

Az ATP, Mg^{2+} arány változásának hatását 4,3 mM ATP-koncentráció mellett az 1. ábrán láthatjuk. Amikor az ATP volt feleslegben a magnéziummal szemben (arány 3,44 és 1,72), az enzim aktivitása magasabb volt, mint ahol az arány 0,86 volt. A Mg^{2+} koncentrációjának további emelése még alacsonyabb aktivitást okozott. A kapott eredményre két magyarázat is lehetséges: a szabad ATP aktiválja, vagy a másik lehetőség, a szabad Mg^{2+} gátolja az enzimet. A további kisérleteinkben az ATP koncentrációja 1,72-szerese volt a Mg^{2+} koncentrációjának.

A szubsztrát koncentráció hatása, a látszólagos K_M értékek meghatározása

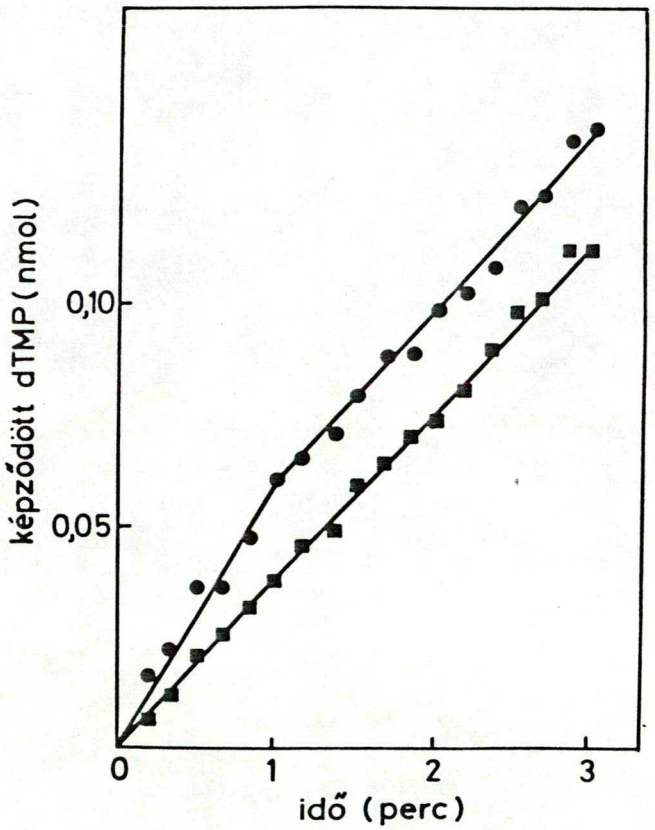
A katalizált reakció sebességének meghatározásakor különböző ATP-koncentrációk mellett, a termékfelhalmozódást mértük az idő függvényében. Azt tapasztaltuk, hogy alacsony ATP-koncentráció mellett a termékfelhalmozódás időben lineáris. Az ATP-koncentrációt 0,5 mM fölé emelve, a termékfelhalmozódás időfüggését két különböző sebességü



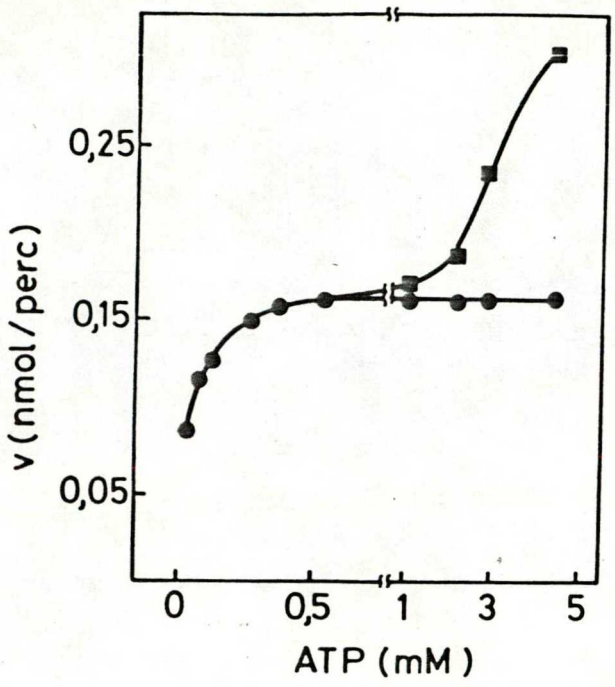
1. ábra A $MgCl_2$ koncentráció változtatásának hatása a timidinkináz enzim aktivitására 4,3 mM ATP jelenlétében. A reakcióelegy mindenben megegyezett a standarddal, kivéve a $MgCl_2$-t. A fehérje koncentráció 150 µg/ml volt. A reakcióelegyben a $MgCl_2$ koncentrációk a következők voltak: 1.25 mM ■ 5,0 mM ● 7,5 mM ▲ 2,5 mM $MgCl_2$ X . A reakcióelegyet 40 °C-on inkubáltuk.

szakaszra bonthatjuk: a pre steady state nagyobb sebességü részt egy lassubb steady state szakasz követi, burst-kinetikát (24) kapunk. Tovább emelve az ATP-koncentrációt, a pre steady state sebesség arányosan növekszik, mig a steady state sebesség változatlan marad (2-3 ábra). A harmadik ábrán látható eredményeket Lineweawer-Burk-féle kettős reciprok ábrázolásba számitottuk át, hogy a látszólagos K_M értékeket kiszámithassuk. A 4A és 4B ábrák alapján a két különböző sebességü részre két különböző K_M értéket határozhatunk meg. ATP-re az alacsonyabb sebességü rész alapján 32 μM, mig a nagyobb sebességü rész alapján 5 mM adódott. A K_M értékeket meghatároztuk timidinre is alacsony és magas ATP-koncentráció mellett (5. ábra). A timidin koncentrációjának változása nem okozott változást a termékfelhalmozódási görbék jellegében. A K_M érték alacsony ATP-koncentráció mellett mérve 3,2 μM volt. Magas ATP-koncentrációnál a K_M értékét pre steady state sebesség változásának alapján állapitottuk meg, amely igy 9,1 μM-nak adódott. Hogyan magyarázhatjuk az ATP-koncentráció változtatásának hatását az enzim kinetikai paramétereinek megváltoztatára? Alacsony ATP-koncentráció mellett a valószinüleg gyenge kötőképességü regulációs kötőhely nincs telitve ATP-vel, nem tapasztalunk rendellenes kinetikát. Az ATP-koncentrációt emelve a regulációs funkcióju kötőhely egy-

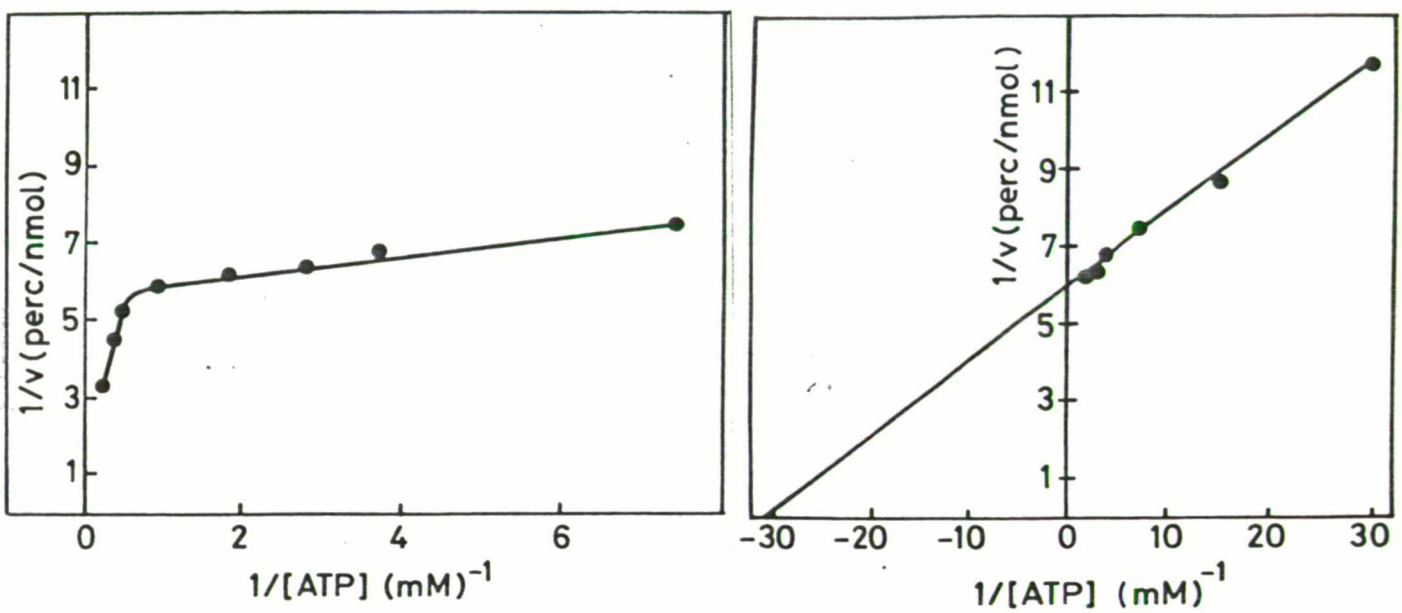
József Attila Tudományegyetem Könyvtára SZEGED



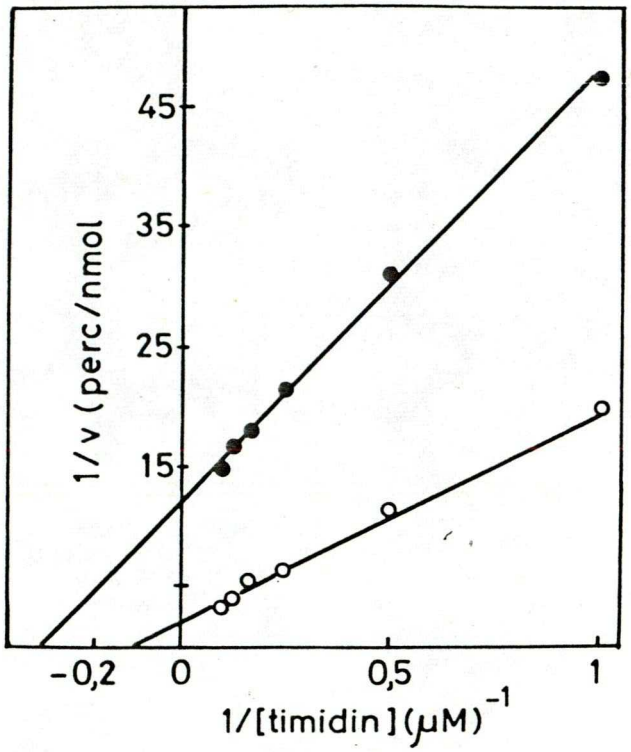
2. ábra A dezoxitimidin-monofoszfát képződés időfüggése 0,27 mM ATP ■ és 4,3 mM ATP ● mellett. A reakcióelegyben a fehérjekoncentráció 50 µg/ml volt. A reakcióelegyet 40 °C-on inkubáltuk.



3. ábra Az ATP-koncentráció hatása a timidinkináz aktivitására konstans timidin koncentráció mellett. Az ATP--koncentráció függvényében ábrázoltuk a pre steady state és a steady state sebességet. Az ATP : Mg arány 1,76 volt. A reakciót 150 µg/ml fehérjekoncentráció mellett mértük 40 °C hőmérsékleten. A pre steady state és a steady state reakciósebesség 0,5 mM ATP-koncentrációig azonos. ■ pre steady state; ● steady state reakciósebesség.



4. ábra Az ATP-koncentráció változásának hatása a dezoxitimidin-monofoszfát képződésének sebességére a kettős reciprok ábrázolásban, a 3. ábra alapján. A-teljes ATP-koncentráció függés, B- a teljes ATP-koncentráció függés második része más léptékben, több mérési ponttal.



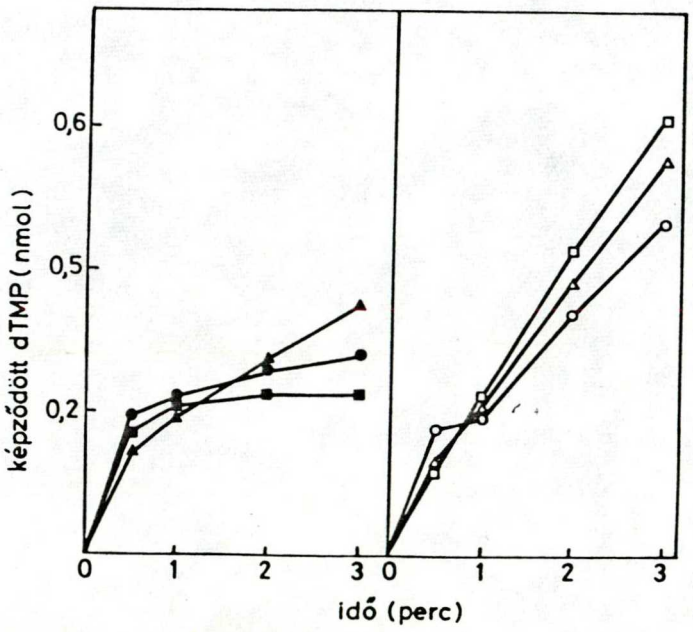
5. ábra A timidin koncentráció változtatásának hatása a dezoxitimidin-monofoszfát képződésének sebességére a kettős reciprok ábrázolásban. A mérések során a fehérje-koncentráció 60 μg/ml volt. 0,27 mM ATP mellett ● ; 4,3 mM ATP-koncentráció ○ mellett mérve.

re inkább telitődik ATP-vel, növekszik az az időtartam, amely alatt az ATP-vel kötött formában van. Az ATP fokozott kötődése a regulációs funkcióju kötőhelyhez hatással lehet a katalitikus funkcióju kötőhelyre, melyet ugy észlelünk, mint a K_M és V_{max} értékek megváltozását ATP-re és timidinre, és a termékfelhalmozódás időfüggése is megváltozik, két fázisra lesz bontható. A K_M értékeknek ezt a megváltozását nem lehet azzal magyarázni, hogy az ATP-re mért K_M érték sokkal kisebb, mint a K_S érték, ami akkor lehetséges, ha az ES-komplexet még további intermedierek követik különböző egyensulyi állandókkal. Ebben az esetben arról lenne szó, hogy a K_S értéknek megfelelően alacsony ATP-koncentrációnál még nincs telitve az ATP-kötőhely, az csak kb. 0,5 mM-nál telitődik. Ezzel a feltevéssel nem lehet kielégitően megmagyarázni a kinetikai paraméterek megváltozását, mivel ez azt jelentené, hogy a K_S érték csak akkor nagyobb a K_M értéknél, ha a szubsztrát nem teliti az enzimet. Kielégitő magyarázatot a kapott jelenségekre csak akkor adhatunk, ha feltételezzük, hogy az enzimnek két ATP-kötőhelye van, két különböző funkcióval. Az egyik funkció a szubsztrát kötés lenne, ahol az ATP-Mg komplex kötődik. A másik egy regulációs funkcióju kötőhely, ahol a szabad ATP kötődik meg.

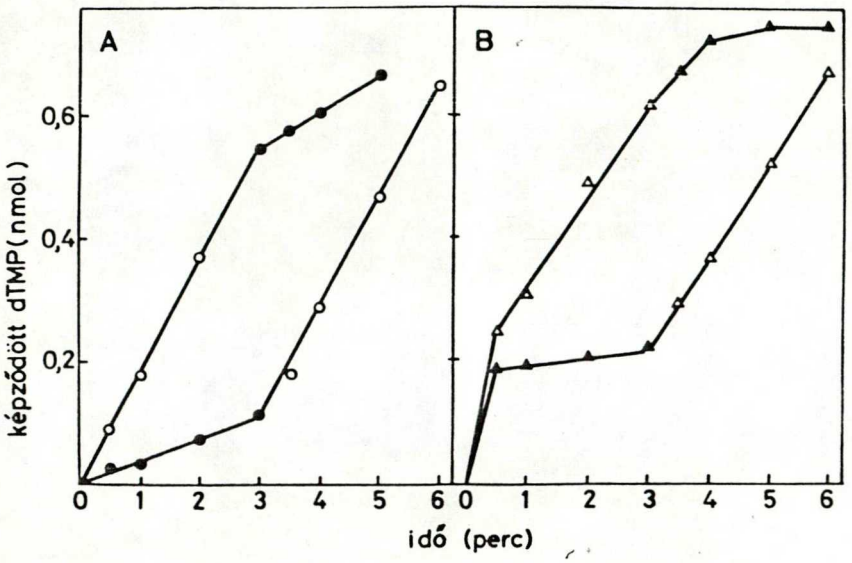
Az enzimnek ATP-vel való előinkubálása nem változtatta meg a termékfelhalmozódás időfüggésének jellegét.

A hőmérséklet hatása a termékfelhalmozódás kinetikájára

A termékfelhalmozódás időfüggését 20, 25, 30, 35, 40 és 45 °C-on mértük magas ATP-koncentráció mellett, (6. ábra). A burst-tipusu kinetika a hőmérséklet csökkentésével egyre kifejezettebbé válik. 45 °C-on a pre steady state sebesség csak kicsivel magasabb, mint a steady state sebesség. 25 °C-on viszont a steady state sebesség gyakorlatilag nulla. A pre steady state sebesség a hőmérséklet csökkenésével növekszik, 20 °C-on magasabb, mint 45 °C-on. Azt, hogy a hőmérsékletnek nemcsak a különböző katalitikus aktivitással rendelkező formákra tett különböző hatásáról van szó, a 35 °C-on való inkubálás kinetikája mutatja. Ezen a hőmérsékleten a magas ATP-koncentráció mellett kialakuló nagyon kis aktivitásu forma át tud alakulni egy jóval magasabb aktivitásu formába, amely 20 °C és 30 °C között nem figyelhető meg, sőt 35 °C felett a katalitikusan szinte teljesen inaktiv forma ki sem mutatható, valószinüleg igen gyorsan átalakul a steady state sebességet adó formába. A magas ATP-koncentráció mellett 20 °C-on kialakuló nagyon kis aktivitásu enzimforma reverzibilisen átalakitható. Ezt a megállapitást egyrészt a többször megismételt és azonos jelleget adó 35 °C-on való inkubálás során kapott kinetika támasztja alá, másrészt a 7. ábrán látható kisérletek. Ebből a kisérletből (7B) megállapithatjuk, hogy az inkubálás hőmérsékletére



6. ábra A hőmérséklet hatása a timidinkináz enzim aktivitására. A mérésekhez standard reakcióelegyet alkalmaztunk, melyben a fehérjekoncentráció 150 µg/ml volt. A reakcióelegyet a következő hőmérsékleteken inkubáltuk:
20 °C ● ; 25 °C ■ ; 30 °C ▲ ; 35 °C ○ ;
40 °C △ ; 45 °C □ .



7. ábra A hőmérséklet változtatásának hatása a különböző hőmérsékleteken kialakuló enzimformákra. A- az ATP-koncentráció a reakcióelegyben 0,27 mM. A reakciót 20 °C-on ● ; illetve 40 °C-on ○ inkubáltuk. Három perc elteltével a megfelelő reakcióelegyet 40 °C-ra melegitettük, illetve 20 °C-ra hütöttük. Az aktivitást ezután további három percig mértük.

B- az ATP-koncentrációja a reakcióelegyben 4,3 mM volt. A reakciót 20 °C-on ▲ ; illetve 40 °C-on △ inditottuk. Három perc elteltével a megfelelő reakcióelegyet 40 °C-ra melegitettük, illetve 20 °C-ra hütöttük.

jellemző kinetikát kapjuk meg, függetlenül attól, hogy előtte milyen hőmérsékleten inkubáltuk a reakcióelegyet. Alacsony ATP-koncentráció mellett nem alakul ki burst--kinetika még alacsony hőmérsékleten sem (7A). Itt is a mindenkori inkubálási hőmérsékletre jellemző katalitikus aktivitást kapjuk meg, függetlenül attól, hogy milyen hőmérsékleten inkubáltunk előzőleg. Azt, hogy a különböző hőmérsékleteken magas ATP-koncentráció mellett különböző kinetikai paraméterekkel jellemezhető enzimformák alakulnak ki, a következő meggondolások is alátámasztják.

Ha azt feltételezzük, hogy nincsenek hőmérséklet indukálta enzimforma átalakulások, hanem csak arról lenne szó, hogy a hőmérséklet változásának hatására a termék ledisszociálása az enzimről erősen megváltozik, nem tudunk két jelenséget megmagyarázni. A termékgátlás miért csak fél perc után alakul ki, és 35 ^{o}C-on miért függesztődik fel egy perc után. Ha pedig azt feltételezzük, hogy az ATP-kötés a regulációs helyen a hőmérséklet csökkentésével gyengül, akkor az alacsony ATP-koncentrációnál mért kinetikát kellene kapnunk.

A kapott kisérleti eredmények alapján arra következtettünk, hogy egy alloszterikus hiszteretikus enzimmel dolgozunk.

Az enzim alloszterikus tulajdonságát több eredmény is alátámasztja. Az enzimnek sikerült két olyan formáját azonositani, amelyek különböző kinetikai tulajdonságokkal rendelkeznek. A két forma közötti kapcsolatot az ATP molekula teremti meg. Az ATP-nek valószinüleg kettős szerepe van a timidinkináz enzim aktivitásának befolyásolásában. Egyrészt a Mg^{2+} -mal képzett komplexe az enzim szubsztrátja, a szabad ATP pedig az enzim alloszterikus effektora. A reakcióelegyben az optimális katalitikus aktivitást ugyanis egy-egy arányu ATP : ATP-Mg^{2+} komplex jelenlétében kaptuk. Az, hogy két enzimformát sikerült megkülönböztetnünk a kinetikai adatok alapján, tulajdonképpen az enzim hiszteretikus tulajdonságainak köszönhető. Abban az esetben nevezünk egy enzimet hiszteretikusnak, ha a szubsztrát vagy alloszterikus effektor koncentrációjának gyors megváltozását az enzimmolekula lassu megváltozása követi. Az enzimmolekula konformációs vagy oligomerizációs-fokbeli változásokon mehet keresztül. A lassuság azt jelenti, hogy a kérdéses reakcióelegyben az enzim mérése során megy végbe az átalakulás a katalizált reakció sebességével összemérhető sebességgel. Az átalakulás során a kiindulási és a keletkező enzimformák kinetikai paraméterei különbözőek lehetnek, igy a termékfelhalmozódás az idő függvényében nem lesz lineáris. Ha az átalakulás során például

egy kevésbé aktiv enzimforma keletkezik burst-tipusu kinetikát kapunk. A katalizált reakció sebessége egyre csökken, mig az enzimformák közötti átalakulás le nem játszódik, majd beáll egy végső sebességre, jelezve, hogy az átalakulás megtörtént. Ezeknek a hiszteretikus átalakulásoknak a jellemzését az irodalomban már igen részletesen kidolgozták. (26,27,28).

Ezzel a lassu átalakulási folyamattal az allosz-terikus szabályozáson kivül egy további lehetőség nyi-lik az enzimek regulációjára. Igy ugyanis olyan enzim-formák lehetnek jelen, amelyek ugyan csak közti állapo-tot képviselnek egy átalakulási folyamatban, mégis a sejt aktuális szükségleteihez jobban igazodó kinetikai paraméterekkel rendelkezhetnek. Hogyan magyarázhatjuk kapott eredményeinket az irodalmi adatokkal összevetve? A dezoxiribonukleozid-trifoszfátok poolja az állati sej-tekben lényegében a DNS-szintézis iniciációjával egyidő-ben növekszik meg, a nukleotidok szintézisében szerepet játszó enzimek aktivitásának fokozódása révén. Különösen feltünő a timidinkináz enzim aktivitásának növekedése, ami bizonyitja fontos szerepét a dTTP képződéséhez vezető katalitikus reakcióban. Azt, hogy az enzim aktivitása miért növekszik meg az S fázisba lépő sejtekben, még nem lehet biztosan tudni. Valószinüleg citoplazmatikus fakto-rok hatásáról van szó, melyek szerepét a DNS-replikáció

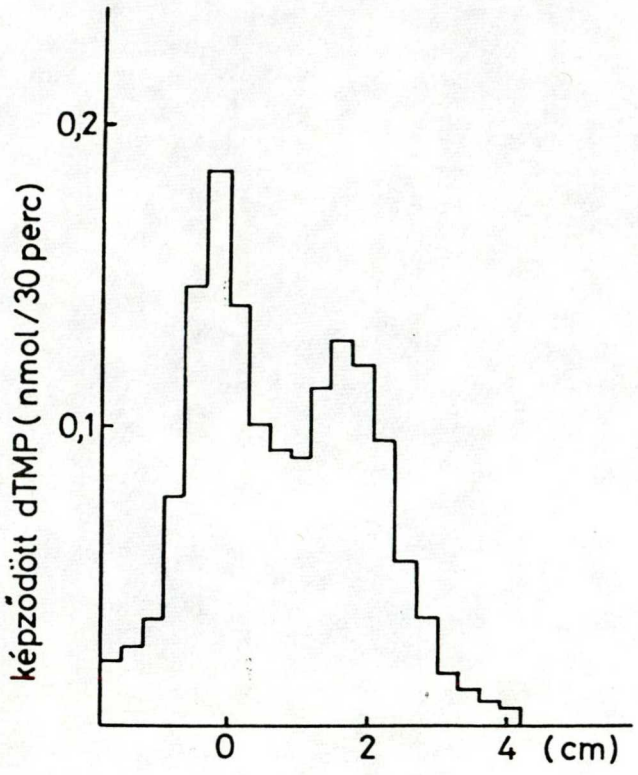
iniciációjában is valószinüsitik. Az enzim hiszteretikus tulajdonságának kihasználását az enzim aktivitásának sejtszinten történő finomabb szabályozásában a következő irodalmi adatok is alátámasztják. Sikerült kimutatni, hogy egy átlagos méretü sejtre számolva az ATP koncentrációja a mM-os nagyságrendbe esik, az ATP koncentrációja az S fázis kezdetén megnövekszik (1). Izolált sejtmagokkal az optimális DNS-szintézist 4-5 mM ATP-koncentráció mellett lehetett mérni. Ezek az adatok bizonyitják, hogy reakcióelegyünkben az ATP-koncentráció hasonló az S fázisba lépő sejtéhez. Tehát a sejtben in vivo is végbemehet az az átalakulás, amit in vitro sikerült kimutatni. Az enzim hiszteretikus alloszterikus tulajdonsága következtében az ATP-koncentráció hatására a sejtben kialakulhat az az enzimforma, amelyet a reakcióelegyben a magas ATP-koncentráció mellett a kezdeti sebességet adó formával azonosithatunk. Ennek az enzimformának a látszólagos K_M értéke viszonylag magas, (5 mM), ugyanakkor a katalizált reakció maximális sebességét ötszörösére képes növelni. Ezen változás eredményeképpen a dezoxitimidin-monofoszfát, és ezen keresztül a dTTP szint gyorsan emelkedhet, mivel a sejtben az ATP szintje már magas, nem limitálja az enzim katalitikus aktivitását.

A timidinkináz enzim hiszteretikus alloszterikus tulajdonságainak vizsgálata elektroforetikus mobilitásának változása alapján

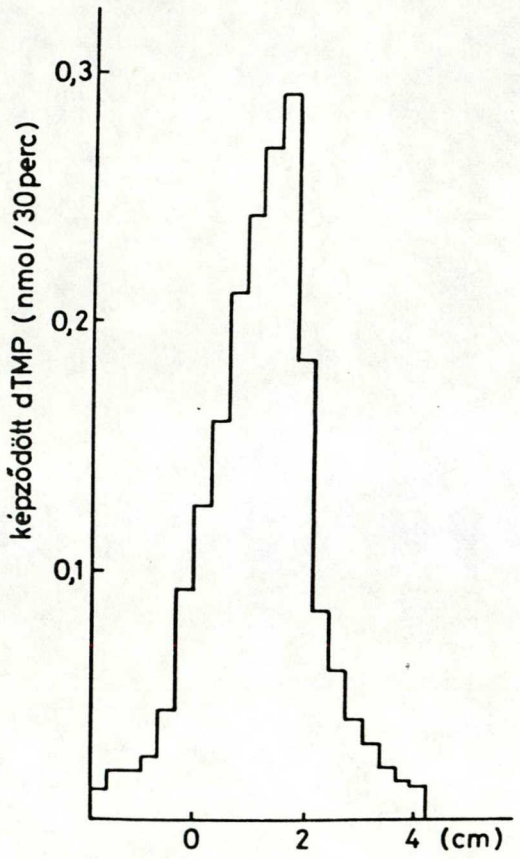
Annak bizonyitására, hogy az ATP-koncentráció változásának hatására a timidinkináz enzim különböző állapotokban van jelen, cellulózacetát-membránelektroforézist végeztünk.

A tisztitott enzimből felvitt mintát az "Anyagok és módszerek" fejezetben leirt körülmények között elektroforetizáltuk. A 8. ábrán láthatjuk, hogy a preparátumban két különböző elektroforetikus mobilitásu aktiv enzimforma van jelen. Az egyik forma a felvitel helyén maradt, mig a másik kb. 2 cm-t vándorolt a pozitiv pólus felé. Az elektroforézist ugy ismételtük, hogy a tankpuffer tartalmazza a reakcióelegy összetevőit, olyan koncentrációban, mint a kinetikai mérések során, (kivéve a ^{14}C timidint, és a tris HCl-t). Magas ATP-koncentráció mellett (9. ábra) azt tapasztaljuk, hogy az elektroforetikus kép egységessé válik, egy aktiv csikot kapunk. Ennek a csiknak a mobilitása megegyezik az előző futtatás során egymástól elvált két enzimforma közül a nagyobb mobilitásuéval. Ennek a kisérletnek alapján arra következtettünk, hogy a felvitel helyén maradó enzimforma magas ATP-koncentráció hatására átalakul a nagyobb mobilitásu formába.

Ezen feltevés alapján az alacsony ATP-koncentráció



8. ábra A tisztitott preparátum cellulózacetát-membrán-elektroforézise. Az elektroforézis körülményei megegyeznek a "Módszerek" fejezetben leirtakkal. 200 µg fehérjét vittünk fel a cellulózacetát membránra. A nullpont a felvitel helyét jelzi. A vizszintes tengelyen a felvétel helyétől mért távolság van feltüntetve, a függőleges tengelyen pedig a 40 ^{o}C-on 30' alatt képződött dTMP mennyiségét ábrázoltuk.



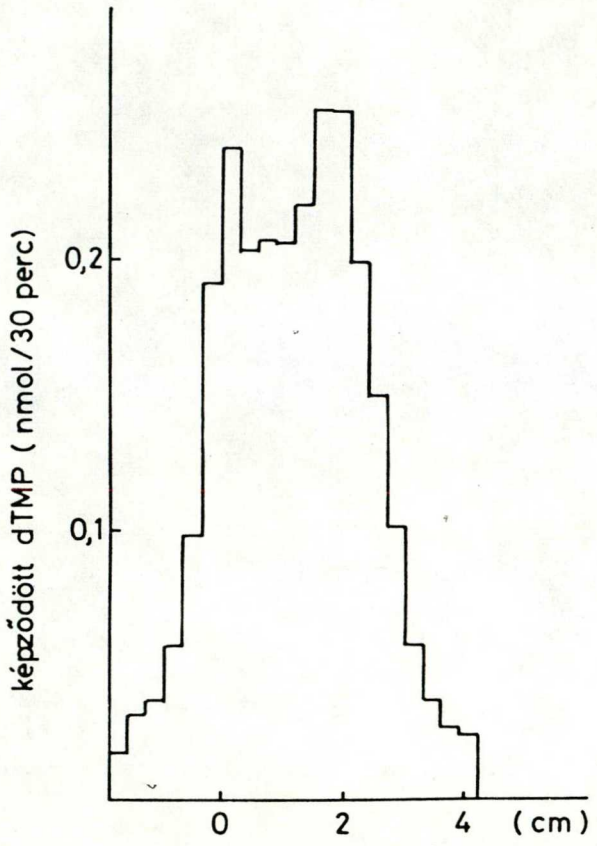
9. ábra Az enzim cellulózacetát-membránelektroforézise magas ATP-koncentráció mellett. A standard elektroforézis puffer tartalmazott még 3 x 10^{-5} M timidint, 2,5 mM $MgCl_2$-ot és 5mM ATP-t is. A többi körülmény a standard körülményekkel megegyezik. A felvitt fehérje mennyisége 200 µg.

mellett kapott eredményt (10. ábra) a következőképpen tudjuk értelmezni. A nagyobb mobilitásu enzimforma alacsony ATP-koncentráció mellett is kialakul. Stabilitása az elektroforézis körülményei között azonban sokkal kisebb, mint magas ATP-koncentráció mellett, hiszen az alloszterikus effektor koncentrációja 1/10-re csökkent. Ha feltételezzük továbbá azt, hogy a kialakuló enzimforma több alegységből áll, akkor a köztes mobilitásu enzimformák megjelenését ennek az oligomernek az elektromos erőtér hatására létrejövő részleges szétesésével magyarázhatjuk.

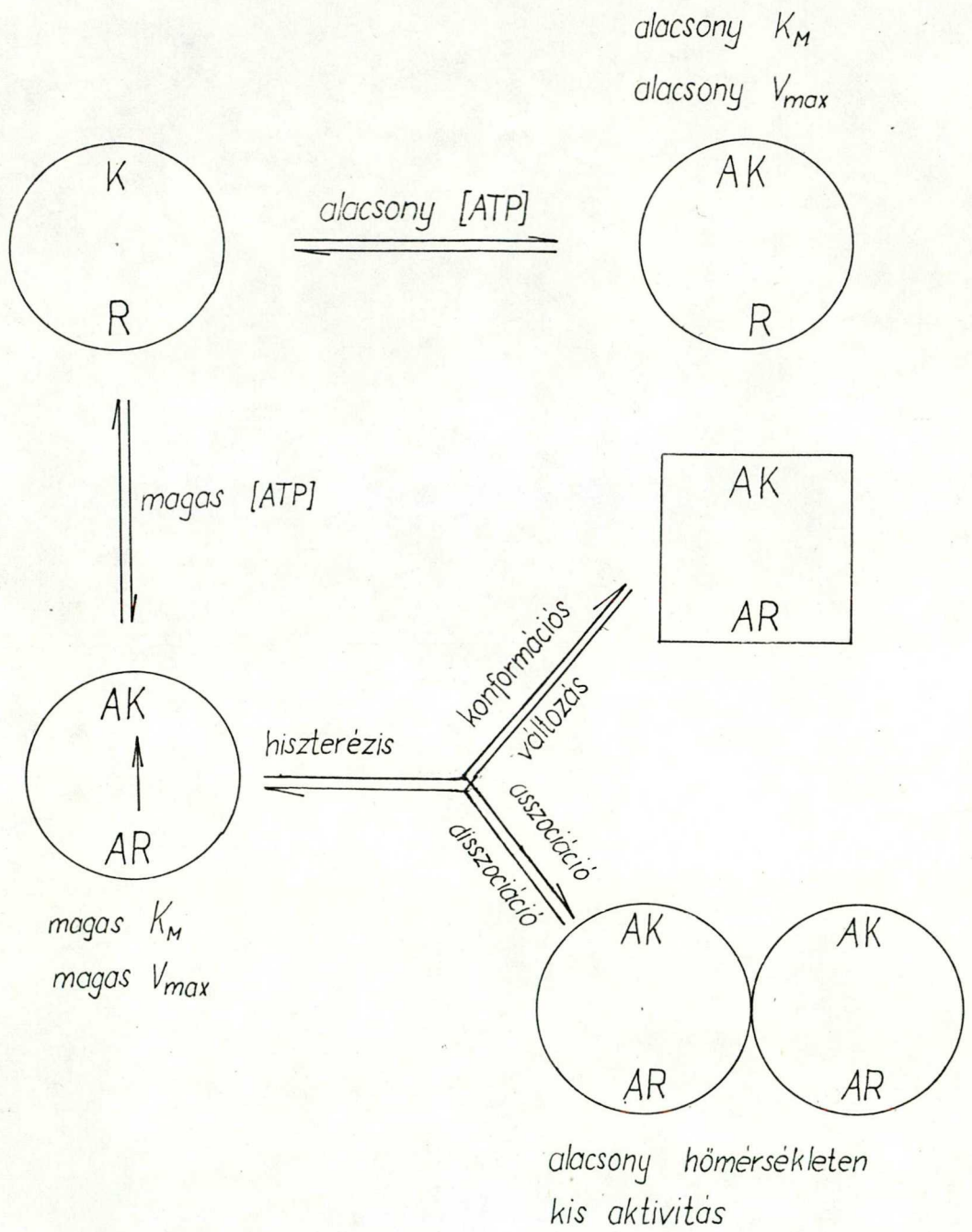
A kapott kisérleti eredményeink alapján a következő modellt dolgoztuk ki a citoplazmatikus timidinkináz enzim tulajdonságainak összefoglalására.

Alacsony ATP-koncentráció hatására a regulációs hely még nem telitődik, erős timidin és ATP-Mg komplex kötés jellemzi ezt az állapotot.

Magas ATP-koncentráció hatására az R-hely telitődik, kölcsönhatásba lép a katalitikus hellyel, igy megváltozik a szubsztrátkötő képesség. Az enzim ebből az állapotból egy hiszteretikus átalakulással egy másik formába megy át. A hiszteretikus átalakulás lehet konformációs változás, de lehet polimerizáltsági fokbeli változás is. Ennek eldöntéséhez további kisérletek szükségesek.



10. ábra Az enzim cellulózacetát-membránelektroforézise alacsony ATP-koncentráció mellett. A standard elektroforézis puffer tartalmazott még 3 x 10^{-5} M dT-t, 0,25 mM $MgCl_2$-ot és 0,25 mM ATP-t is. A futtatás többi paramétere a standard körülményekkel azonos. A felvitt fehérje mennyisége 200 µg.



K-val a katalitikus helyet

R-rel a regulációs helyet jelöltük az enzimmolekulán.

Az enzimet gradiens centrifugálással próbáljuk tisztitani olyan körülmények között, ahol az enzim a legegységesebbnek bizonyult, magas ATP-koncentráció mellett. Ezzel a módszerrel még lehetőség lenne arra is, hogy a szubsztrát koncentráció változás hatására bekövetkező átalakulások milyenségét - konformációs, oligomerizációs fokbeli változás - is kimutathassuk, feltételezéseinket jobban alátámaszthassuk.

SZTE

Összefoglalás

A timidinkináz enzim fontos szerepet játszik a DNS szintézisét közvetlenül megelőző folyamatokban. Az enzim timidin-5'-monofoszfát képződését katalizálja. A szubsztrátok a timidin és az ATP, illetve ennek Mg^{2+} -vel képzett komplexe. Ismeretes, hogy az enzim feed back gátolható a DNS-polimeráz egyik szubsztrátjával, a dTTP-vel, valamint az, hogy a TK enzim szintje és specifikus aktivitása is változik a sejtciklus során. Ezekből az irodalmi adatokból gondoltuk azt, hogy az enzim tulajdonságainak vizsgálata értékes adatokat nyujthat a katalitikus aktivitását befolyásoló mechanizmusokról. Az enzimet fiatal patkányok lépéből tisztitottuk, mivel a szervben folyó differenciáció miatt az enzim mennyisége nagy, specifikus aktivitása magas.

A tisztitás során 20-30-szoros specifikus aktivitás növekedést sikerült elérni. Irodalmi adatokkal összhangban a különböző kromatográfiás eljárások nem bizonyultak hatékonynak, az enzim részleges vagy teljes inaktiválódásához vezettek. Azt azonban sikerült elérnünk, hogy a tisztitott preparátum nem tartalmaz a katalitikus aktivitást zavaró enzimeket és a tárolás körül-

ményei között stabilnak bizonyult. Ezért ezzel a preparátummal megkezdtük az enzim tulajdonságainak vizsgálatát, melyeket a következőkben lehet röviden összefoglalni:

1. Az enzim kinetikai vizsgálata

   a./ Az enzimreakció pH optimuma 8,0.

   b./ Az enzim 2:1-es ATP : Mg^{2+} arány mellett mutat optimális aktivitást.

   c./ Az ATP-koncentráció függvényében ábrázolva a katalizált reakció sebességét, kettős telítési görbét kapunk. Ennek megfelelően az enzim-ATP-magnézium komplex stabilitását és az enzim-timidin komplex stabilitását is két-két értékkel jellemezhetjük.

   d./ Az ATP-koncentrációtól függően a katalizis során a szubsztrát-felhalmozódás időfüggése változik. Alacsonyabb ATP-koncentráció mellett lineáris, magas ATP-koncentráció mellett két különböző sebességü részre osztható, pre steady state gyorsabb, és steady state lassubra. A steady state állapotnak megfelelő enzimmolekula alacsonyabb hőmérsékleten (20 ^{o}C) igen kis aktivitással katalizálja a dTMP képződést. Ezekből az adatokból arra következtettünk, hogy egy alloszterikus hiszteretikus enzimmel dolgozunk.

2. Az enzim hiszteretikus tulajdonságainak vizsgálata

a./ Cellulózacetát-membrán elektroforézissel két katalitikusan aktiv komponensre válik szét az enzim.

b./ Ha az elektroforetikus rendszerben jelen vannak a szubsztrátok is, magas ATP mellett csak a nagyobb mozgékonyságu enzimforma van jelen. Alacsony ATP-koncentráció mellett viszont köztes mobilitásu aktiv formák is jelen vannak.

A kisérleti adatokból a következőket állapithatjuk meg.

Az enzimmolekula aktuális állapota az ATP-koncentrációjával mutat szoros összefüggést. Az ATP--koncentrációjának változása a kinetikai adatok alapján befolyásolja az enzimmolekula állapotát, ami viszont az enzim-katalizis kinetikai paramétereinek megváltozását vonja maga után. Ezzel a regulációs mechanizmussal az enzim finomabb, a sejt aktuális szükségleteit érzékenyen követő változásokon megy át.

Irodalomjegyzék

1. E. Rapaport, M.A. Garcia-Blanco, and P.C. Zamecnik Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 1643 (1979)

2. Saul Kit Mol. and Cell. Biochem. 11, 161 (1976)

3. R-Okazaki and A. Kornberg, JBC 239, 269 (1964) R-Okazaki and A. Kornberg, JBC 339, 275 (1964)

4. S.-H. Kobayashi, H.R. Hubbel and A. Orengo, Biochemistry 13, 4537 (1974)

5. E. Bresnick and U.B. Thompson, JBC 240, 3967 (1965)

6. T. Hashimoto, T. Arima, H. Okuda and S. Fujii, Cahcer Res 32, 67 (1972)

7. Y.C. Cheng and W.H. Prusoff, Biochemistry 13, 1173 (1974)

8. E.P. Kowal and G. Markus, Prep. Biochemistry 6, 369 (1976)

9. L.-S. Lee and Y.-C. Cheng, JBC 251, 2600 (1976)

10. D.E. Kizer and L. Holman, BBA 350, 193 (1974)

11. H. Nawata and T. Kamiya, J. Biochem. 78, 1215 (1975)

12. M.O. Her and R.-L. Momparler, JBC 246, 6152 (1971)

13. T.I. Kalman and T.J. Bardos, Mol. Pharmacol. 6, 621 (1970)

14. E. Bresnick and S.S. Williams, Biochem. Pharmacol. 16, 503 (1967)

15. A.T. Taylor, M.A. Stafford and O.W. Jones, JBC 247, 1935 (1972)

16. N. Iwatsuki and R. Okazaki, J. Mol. Biol. 29, 139 (1967)

17. N. Iwatsuki and R. Okazaki, J. Mol. Biol. 29, 155 (1967)

18. R. Adler and B.R. McAuslan, Cell. 2, 113, (1974)

19. B. Munch-Petersen and G. Tyrsted BBA 478, 364 (1977)

20. L.-S. Lee and Y.-C. Cheng, Biochemistry 15, 3686 (1976)

21. T.T. Breitman BBA 67, 153 (1963)

22. O.H. Lowry, N.J. Rosenbrough, A.L. Farr and R.J. Randall, J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)

23. Reimann and Umfleet, BBA 523, 516 (1978)

24. C. Frieden, J. Biol. Chem. 245, 5788 (1970)

25. C. Frieden, Ann. Rev. Biochem. 48, 471 (1979)

26. B.I. Kurganov, A.I. Dorozhko, Z.S. Kagan and V.A. Yakovlev, J. Theor. Biol. 60, 247 (1976)

27. B.I. Kurganov, A.I. Dorozhko, Z.S. Kagan and V.A. Yakovlev, J. Theor. Biol. 60, 271 (1976)

28. B.I. Kurganov, A.I. Dorozhko, Z.S. Kagan and V.A. Yakovlev, J. Theor. Biol. 60, 287 (1976)

Ezuton is szeretném megköszönni Dr. Nagy Juditnak és Dr. Dénes Gézának, valamint a megszüntetett Anyagcsere--szabályozás Csoport egykori munkatársainak a munkámhoz nyujtott segitséget.