B 1747

FEHÉRJE-FEHÉRJE KÖLCSÖNHATÁSOK TANULMÁNYOZÁSA AFFINITÁS SZORBENSEK SEGITSÉGÉVEL

Doktori értekezés

Kálmán Miklós

JATE, Biokémiai Tanszék, Szeged

1980.

Tartalomjegyzék

I. Bevezetés..... 1.old.

II. Irodalmi áttekintés..... 3.old.

Fehérjék közötti kölcsönhatás vizsgálata..... 3.old.

Az affinitáskromatográfia alkalmazásai 6.old.

Fehérje-fehérje kölcsönhatások a gliceraldehid 3-foszfát dehidrogenáz enzim alegységei, valamint a GAPD és az aldoláz enzim között..... 10.old.

III. Módszerek..... 12.old.

A GAPD és az aldoláz tisztitása..... 12.old.

GAPD aktivitásmérés..... 12.old.

A GAPD NAD-tartalmának meghatározása. 13.old.

Aldoláz aktivitásmérés..... 13.old.

Gliceraldehid 3-foszfát preparálása.. 14.old.

Blue Dextrán Sepharose 4B gél készitése..... 14.old.

A gél ligand koncentrációjának meghatározása..... 17.old.

A gél effektiv ligand koncentrációjának meghatározása..... 17.old..

NAD immobilizálása CH-Sepharose 4B gélre..... 18.old.

GAPD kromatográfiája Blue Dextrán Sepharose 4B oszlopon..... 19.old.

GAPD és aldoláz együttes kromatográfiája Blue Dextrán Sepharose 4B oszlopon..... 20.old.
GAPD kötődése Blue Dextrán Sepharose 4B gélen egyensulyi batch rendszerben..... 20.old.
GAPD szorpciója NAD-Sepharose 4B gélen aldoláz jelenlétében..... 21.old.
IV. Kisérleti rész..... 22.old.
A./ A GAPD alegységei közötti kölcsönhatás vizsgálata..... 22.old.
A GAPD és a Blue Dextrán közötti kölcsönhatás jellege..... 22.old.
A GAPD-Blue Dextrán komplex sztöchiometriájának vizsgálata..... 24.old.
A GAPD és a Blue Dextrán közötti kölcsönhatás függése a GAPD koncentrációjától..... 27.old.
A GAPD-Blue Dextrán komplex disszociációs állandójának meghatározása egyensulyi batch rendszerben..... 33.old.
B./ Az aldoláz és a GAPD közötti kölcsönhatás vizsgálata..... 39.old.
Aldoláz és GAPD együttes kromatográfiája Blue Dextrán Sepharose 4B oszlopon..... 39.old.
Az aldoláz és a GAPD közötti komplex disszociációs állandójának meghatározása.. 42.old.

József Attila Tudományegyetem Könyvtára SZEGED

V. Összefoglalás. ..... 48. old.

VI. A szövegben előforduló rövidítések.. 50. old.

VII. Irodalomjegyzék..... 51. old.

I.

BEVEZETÉS

A struktura és a funkció egymást feltételező egysége az egyik általános rendező elv, amely az anyagi világ minden szintjén érvényesül.

"A sejtben lejátszódó folyamatok és a sejt strukturáinak felbonthatatlan egysége teremti meg az életbenmaradásnak, az élet stabilitásának, az önszabályozásnak és a fejlődésnek a fundamentumát."/Dubinyin 1963./

A sejteket felépitő molekulák között bonyolult funkcionális kölcsönhatások állnak fenn, melyek feltételezik, hogy a sejt szerkezetét tekintve is hasonlóan sokoldalu kölcsönhatásoknak kell érvényesülniük. A sejten belül a biológiai mozgásforma szempontjából lényeges strukturáltsági szintek a következők: a biomolekulák belső, molekuláris szerkezete, az egyes biomolekulák között kialakuló komplexek, a citoplazmatikus szerkezet, a különféle membránstrukturák, s a sejtben található sejtorganellumok.

A sejt szervezettségi szintjeinek megismerése az egyszerütől a bonyolult felé halad. A molekuláris biológia első látványos sikerei az egyes biomolekulák - enzimek, nukleinsavak stb. - szerkezetének és funkciójának felderitéséhez füződnek. Az enzimek esetében ez egyet jelentett azok fizikai, kémiai, biokémiai paramétereinek leirásával.

Ezt követte - ugyancsak az enzimeknél maradva - a különféle reakciósorok, s a benne szerepet játszó enzimek feltárása. Ebben a megismerési folyamatban a következő lépést a fent említett funkcionális kapcsolat /pl. egy reakciósorban részt vevő enzimek között/ kialakulását biztosító szerkezeti kölcsönhatások feltérképezése jelenti. Jól bizonyitja ezt a fehérje-fehérje, fehérje-lipid, fehérje-nukleinsav kölcsönhatást kimutató, s az azt vizsgáló közlemények egyre gyarapodó száma.

Az alkalmazott vizsgálati módszerek legtöbbször komoly müszeres hátteret feltételeznek, ezért munkánk során olyan, egyszerübb kisérleti feltételek között is használható módszer után kutattunk, amellyel tanulmányozhatók a biomolekulák közötti kölcsönhatások, legyen az akár egy oligomer enzimmolekula alegységei között fennálló kölcsönhatás, akár különböző enzimek között kialakuló komplex.

II.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Fehérjék közötti kölcsönhatások vizsgálata

Az elmult két évtizedben a fehérjék, köztük az enzimek nagyobb egységekké történő szerveződését alapos vizsgálat alá vették. /Kirschner,1972.,Friedrich 1975./ Az eddigi kisérleti eredmények alapján az enzimek között kialakuló komplexeket két nagyobb csoportra lehet felosztani.

A monofunkcionális enzimkomplexek több, egymással azonos alegységből épülnek fel, mint pl. az LDH,GAPD, ..., amelyek egyetlen reakciót katalizálnak.

A másik csoportot a multifunkcionális enzimkomplexek alkotják, melyek két vagy több reakció katalizisét végzik összehangoltan. Az ebbe a csoportba tartozó komplexeket még további két alcsoportra választhatjuk szét, melyek közül az egyikbe azok az enzimkomplexek tartoznak, amelyek ugy tekinthetők, mint különböző funkcióju alegységekből felépülő enzimek, ahol az alegységek között a kölcsönhatás viszonylag erős. Tisztitás során ennek eredményeképp maga a komplex is kinyerhető pl. piruvát-dehidrogenáz /Henning, 1972./ zsirsav-szintetáz /Sumper, 1972./

A másik alcsoportot azok az enzimkomplexek alkotják, amelyekben az alkotórészek közötti kölcsönhatás viszonylag gyenge. A komponensek általában csak külön-külön tisztithatók, esetleg extrém körülmények között, mint pl. nyers sejthomogenizátumból végzett gélkromatográfiás tisztitás a glikolitikus komplex esetében /Mowbray,1976./ - jelenik meg a komplex viszonylag sértetlenül.

A multienzimkomplexek vizsgálatára számos módszert dolgoztak ki. Röntgendiffrakciós vizsgálatokkal megadható az oligomer enzimek pontos térbeli strukturája. A röntgendiffrakciós képből a szekvencia ismeretében leolvashatók az alegységek közötti kontakt felületet alkotó peptidszakaszok is /Blow, 1970./. A módszer hátránya egyrészt, hogy az eljárás rendkivül hosszadalmas és bonyolult, s a vizsgálathoz szükséges idő a vizsgált objektum méretnövekedésével aránytalanul megnő, másrészt, hogy az eljárás csak a jól kristályositható enzimekre alkalmazható. Az un. "laza"enzimkomplexeket még nem sikerült kristályos formában előállitani.

A gyorsreakciókinetikai módszerek /stopped flow/ is lehetőséget nyujtanak az enzimkomplexek tanulmányozására. Mivel ezzel a technikával nagy enzimkoncentráció mellett is végezhetők a kinetikai mérések, lehetőség nyilik még a "laza" enzimkomplexek kimuta-

tására is a kinetikai görbék analizise utján /Ovádi 1978, Thomas, 1979./

A fluoreszencia depolarizációs mérések is alkalmasak a fehérjék közötti kölcsönhatások kimutatására. A komplex képződésekor fellépő részecskeméretnövekedést a depolarizációs mérésekkel követni lehet. /Ovádi,1978/, Churchich,1978./

Ugyancsak ezt, a komplexképződéskor fellépő méretnövekedést használták ki Stonehauer és munkatársai /1979/, akik a citokróm c és a citokróm b_5 közötti kölcsönhatás kimutatására Sephadex G-75 gélt alkalmaztak. A fehérjék gél és oldatfázis közötti megoszlását mérve követték a komplexképződéskor fellépő mólsulynövekedést.

Backman és munkatársai /1976/ a fehérje-fehérje kölcsönhatás tanulmányozására az un. "counter-current distribution" módszert alkalmazták. Egy kétfázisu folyadékrendszerben /mindkét fázis tartalmaz vizet/ vizsgálták az asszociáló fehérjék megoszlását. A módszerrel meghatározható a komplex disszociációs állandója is.

Érdekes megközelités a fehérjék közötti kölcsönhatás tanulmányozására W.Chan /1976/ módszere. Immobilizált több alegységes enzimekkel végzett kisérletekben vizsgálta a közeg hatását az enzimek asszociációs-disszociációs tulajdonságaira.

Az alegységek közötti kölcsönhatás tanulmányozására Osborne és Hollaway /1975/ hibridizációs kísérleteket végeztek. A különböző forrásból származó gliceraldehid 3-foszfát dehidrogenáz enzimek között kialakuló hibrideket gélelektroforézis segitségével vizsgálták.

Az affinitáskromatográfia alkalmazásai

Az affinitáskromatográfia Cuatrecasas /1971/ úttörő kisérletei nyomán ma már széles körüen alkalmazott módszer a biomolekulák tisztitási eljárásaiban. Az affinitáskromatográfiás eljárásoknál olyan géloszlopot alkalmaznak, amely a tisztitandó biomolekulával specifikus kölcsönhatásra képes ligandot tartalmaz. Az utóbbi években szaporodnak azok a közlemények, amelyek a mátrix és a biomolekulák - pl. enzim - közötti kölcsönhatást magát veszik vizsgálat alá. Az affinitáskromatográfiának ezt a válfaját kvantitativ affinitáskromatográfiának nevezik /Chaiken, 1979./

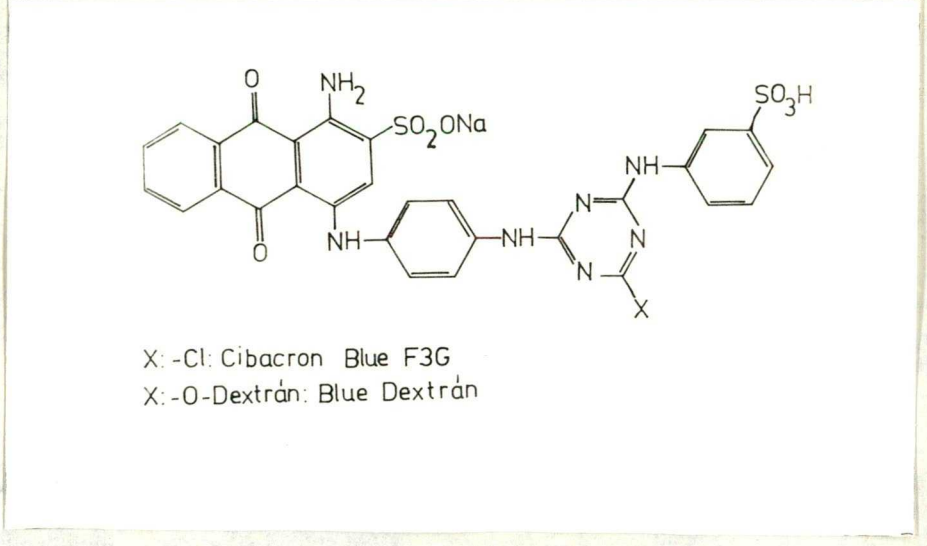
Meghatározzák a komplex disszociációs állandóját, valamint tanulmányozzák a komplex kialakulásának feltételeit, vizsgálva annak függését a gél ligand koncentrációjától a felvitt enzimkoncentrációtól.... /.

Powell és Morrison /1979/az affinitáskromatográfiát a korizmát mutáz-prefenát dehidrogenáz és az aromás aminosav aminotranszferáz enzimek közötti kölcsönhatás

kimutatására alkalmazták, vizsgálva az elueiós profil változását ha egyik, illetve mindkét enzimet kromatografálták, azonban a módszert csak a komplex létének bizonyitására használták fel.

Fex és munkatársai /1979./ a prealbumin és a retinolkötő fehérje közötti kölcsönhatást vizsgálták affinitáskromatográfia segitségével. Jelentős hátránya a fenti kromatográfiás módszereknek, hogy a disszociációs állandó meghatározására csak igen bonyolult összefüggés segitségével nyilik lehetőség /Nichol,1974., Danner,1979./.

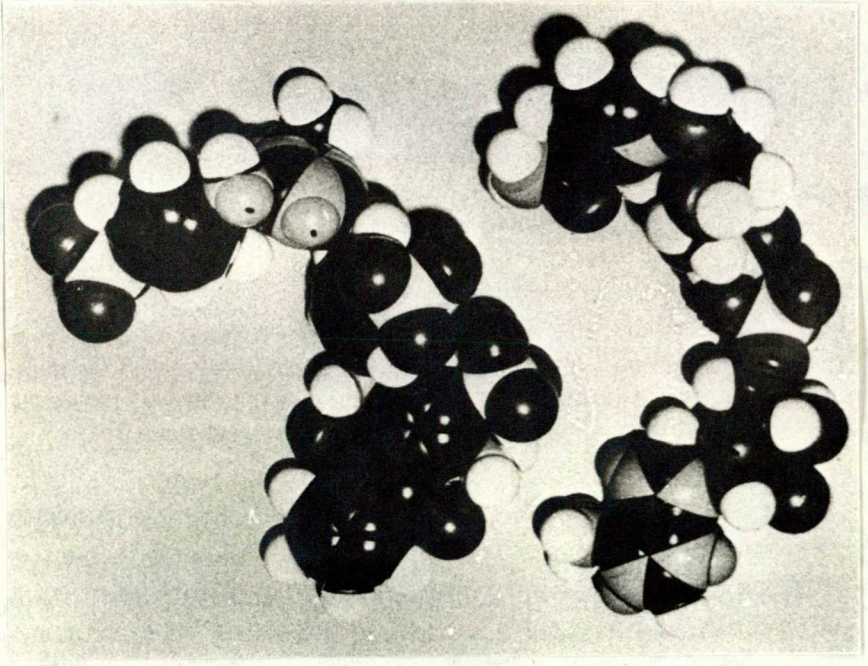
A Blue Dextrán Sepharose 4B gél, igen elterjedten használatos affinitás szorbens a különféle tisztitási eljárásokban. /Haff, 1978./ A festékmolekula a Cibacron Blue F3G, szerkezete, amely tulajdonképpen a gél "hatóanyaga" az 1. ábrán látható.



1. ábra

A Cibacron Blue F3G és a Blue Dextrán szerkezeti képlete.

A térkitöltési modelleket vizsgálva a Cibacron Blue F3G strukturálisan a NAD/P/, illetve az AMP szerkezetére emlékeztet. Ez teszi lehetővé, hogy a Blue Dextrán Sepharose 4B gélt főként dehidrogenázok és kinázok tisztitására felhasználhassák. /Thompson, 1975.//2.ábra/.



2. ábra

A Cibacron Blue és a NAD térkitöltési modellje

A Blue Dextrán Sepharose 4B gélen azonban számos más tipusu enzim is képes megkötődni, mint pl. az aldoláz, a kimotripszinogén, a citokróm c, az interferon, ... stb. Felülvizsgálásra szorul tehát az a korábbi állitás, mely szerint csak azok a fehérjék képesek megkötődni a Blue Dextrán Sepharose 4B gélen, amelyek un.

József Attila Tudományegyetem Könyvtára SZEGED

"dinukleotid fold"-ot, azaz nukleotid kötőhelyet tartalmaznak /Thompson 1976., Stelwagen 1977./.
A dehidrogenázokban a dinukleotid fold léte bizonyitott, de pl. a citokróm c, vagy a kimotripszinogén esetében nem lehet kimutatni a nukleotid-kötő helyet.

Beissner /1979/ azt állitja, hogy a Cibacron Blue F3G festéket tartalmazó oszlop nemhogy csak nem megfelelő eszköz a dinukleotid fold kimutatására, hanem tulajdonképpen nem is nevezhető szigoru értelemben vett affinitás szorbensnek, hanem olyan "lokalizált kationcserélőnek", amely képes hidrofób kölcsönhatásra is.
Ennek a feltételezésnek ellentmond az a tény, hogy nem képes minden fehérje megkötődni a gélen, márpedig egy ioncserélőn a pH-tól függően bekövetkezik a szorpció, továbbá, hogy a megkötődött enzimek már kis / 10^{-3}M/ szubsztrát koncentrációnál eluálódnak az oszlopról, ami specifikus kölcsönhatásra utal.

Fehérje-fehérje kölcsönhatások a gliceraldehid 3-foszfát dehidrogenáz enzim alegységei, valamint a GAPD és az aldoláz enzim között

A GAPD a glikolizis egyik kulcsenzime. Katalitikus funkciója a PGA oxidációja és foszforolizise DPGA-vá. Négy egymással azonos alegységből felépülő enzim, /Harris, 1968/ amely higitással dimerekre illetve monomerekre disszociál /Hoagland, 1969., Lakatos 1972./ A NAD, a PGA illetve a P_i hatása az enzim asszociációs-disszociációs tulajdonságaira nem egyértelmü /Hoagland, 1969., Lakatos 1972., Schmidt 1973./ Kinetikai vizsgálatok valószinüsitik /Ovádi 1979/, hogy a PGA eltolja az egyensulyt a disszociáció irányába. Ultracentrifugán végzett ülepitési kisérletekben nem sikerült a disszociációt, azaz az alegységeket kimutatni /Lakatos, 1976/.

Az aldoláz ugyancsak a glikolizis enzime, amely az FDP-t hasitja PGA-ra és DHP-ra, azaz a reakciósorban a GAPD-t közvetlenül megelőző enzim. Ez is egy négy alegységes enzim, de az eddig ismert adatok szerint még nagy higitásban sem disszociál.

A glikolitikus enzimek közötti kölcsönhatás létét már régóta sokan feltételezték /Clarke,1973, Földi,1973/. Mowbray és Moses 1978-ban az E. coli tömény nyers homogenizátumából Biogel A5M oszlopon eg y 1,6 x 10^6 dalton "molsulyu" komplexet izolált, amely mutatta a teljes

glikolizist. A tisztitott glikolitikus enzimek közötti kölcsönhatás kimutatására végzett ultracentrifugás ill. gélszüréses kisérletek sikertelenek voltak.

Az első egzakt kisérletes bizonyitékot az aldoláz és a GAPD közötti kölcsönhatás létére a kinetikai vizsgálatok hoztak /Ovádi 1978/. Nem sokkal ezután fluoreszcencia depolarizációs mérésekkel sikerült kvantitative is jellemezni a két enzim közötti kölcsönhatást. A komplex disszociációs államdóját $2,5 \times 10^{-7}$ M-nak találták. /Ovádi, 1978./

III.

MÓDSZEREK

A GAPD és az aldoláz tisztitása

A kisérletek során négyszer átkristályositott nyúl-ill. disznóizomból izolált GAPD-vel dolgoztunk, melyet Elődi és Szörényi módszere szerint tisztitottunk. Az aldolázt, melyet Taylor módszere alapján preparáltuk, háromszor kristályositottuk át. Az enzimeket a kisérletek előtt Sephadex G-25 ill. Sephadex G-100 oszlopon gélszürtük, 50 mM tris/HCl pH 7,5 pufferben, hogy az ammóniumszulfátot ill, a GAPD-ből az esetleges mioglobin szennyezéseket eltávolitsuk. A gélszürés után a GAPD NAD-tartalma 2,5 mol NAD/mol tetramer enzim volt. Az enzimek koncentrációját spektrofotometriásan mértük a következő extinkciós koefficiensek segitségével: GAPD $E_{280}^{o,1\%} = 1,00$; aldoláz $E_{280}^{o,1\%} = 0,75$ /Fox,1956./

GAPD aktivitásmérés

Az enzim aktivitását spektroforometriásan határoztuk meg 298 K-en a következő reakcióelegyben: 2 mM NAD, 2 mM PGA, 1 mM arzenát, 50 mM tris/HCl pH 7,5 pufferben. A reakciót 0,5-1,0 µg GAPD-vel inditottuk. Ilyen körülmények között a nyul GAPD specifikus aktivitása 230-250 katal/mol, a disznóizom GAPD-é 200-230 katal/mol volt. Az enzim molekulasulyát 145ooo-nek vettük /Elődi,1958/.

A GAPD NAD-tartalmának meghatározása

A GAPD NAD-tartalmát enzimatikusan mértük a GAPD katalizálta reakcióval. A reakcióelegy összetétele a következő volt: 2 mM PGA, 1 mM arzenát, 4 x10^{-6}M GAPD 50 mM tris/HCl pH 7,5 pufferben. Mértük az elegy fényelnyelését 340 nm-en, majd bemértük a NAD-ot tartalmazó mintát, s miután a reakció lejátszódott /kb 20 perc/ ujból megmértük az elegy fényelnyelését.

A kezdeti és a végső extinkcióérték, valamint a NADH extinkciós koefficiensének ismeretében / E =6,22x 10^{3} M^{-1} cm^{-1}/ a NAD koncentráció megadható.

Aldoláz aktivitásmérés

Az aldoláz aktivitásmérését GAPD, mint segédenzim felhasználsával spektrofotometriásan végeztük 298 K-en. A reakcióelegy összetétele a következő volt: 2 mM NAD, 1 mM arzenát, 1 mM FDP és 4 x 10^{-6}M GAPD 50 mM tris /HCl pH 7,5 pufferben. A reakciót 1- 10 µg aldolázzal inditottuk. Az enzim specifikus aktivitása 24-28 katal/mol volt.

Gliceraldehid 3-foszfát preparálása

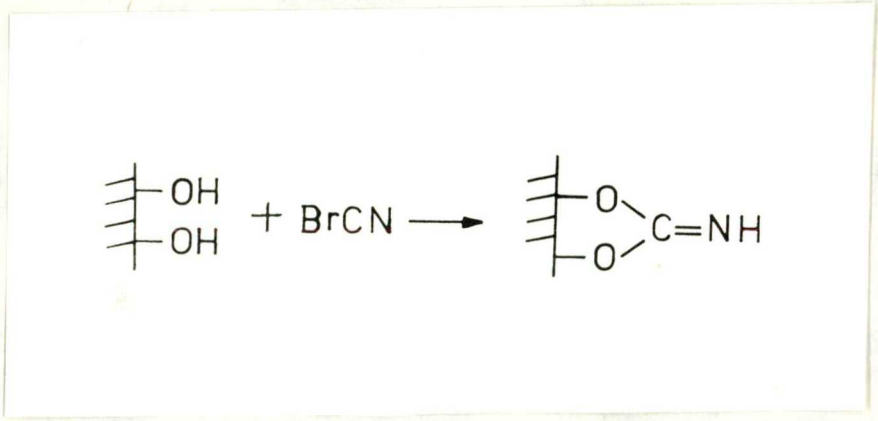
A gliceraldehid 3-foszfát preparálását Szewczuk módszere szerint végeztük FDP-ből kiindulva azzal a különbséggel, hogy a báriumot nátriumszulfáttal csaptuk le. Az eljárás a következő volt: 10 g fruktóz 1,6-difoszfát Ba-sóját feloldottuk o,1 N HCl-ban. Ehhez hozzáadtunk lo,5 ml 2 M Na_2SO_4-ot, a kivált $BaSO_4$ csapadékot lecentrifugáltuk. A felüluszóhoz 50 ml 1 M HIO_4-ot adtunk és 15 percig jég között állni hagytuk. Eztuán hozzáadtunk 8 ml etilénglikolt és 30 percig állni hagytuk 273 K-en. Az elegy pH-ját 2 N NaOH-dal pH 7,2-re állitottuk és 1:1 arányban hideg etilalkoholt adtunk hozzá. Miután két órát állt 273 K-en, a kivált fehér pelyhes csapadékot hütőben leszürtük. A szürlethez 35 ml 1 M Mg-acetátot és 1:1 arányban hideg etilalkoholt adtunk. Egy óra állás után leszürtük. A szürlethez 25 ml 1 M Ca- acetátot adtunk, aminek hatására leválik a PGA Ca-só formájában. A csapadékot lecentrifugáltuk és mostuk 50 %os hideg etilalkohollal. A csapadékot vákuumexsiccátorban vizmentes $CaCl_2$ fölött hidegen szárítottuk. A kitermelés 20 %-os volt. A PGA-t mélyhütőben tároltuk.

Blue Dextrán Sepharose 4B gél készitése /Ryan,1974./

A Sepharose 4B aktivitása

20 ml Sepharose 4B gélt /Pharmacia/ 500 ml desztillált vizzel mostunk üvegszürőn. A leszivatott gélhez 20 ml deszt.

vizet adtunk és a gélszuszpenzió pH-ját 11,o-re állítottuk 1 N NaOH-dal. A gélszuszpenzióhóz elszivófülke alatt 6 g szilárd BrCN-t adtunk kis részletekben, közben 10 N NaOH adagolásával a pH-t 10,5 és 11,0 között tartottuk. A reakcióedényt 288 - 293 K-en termosztáltuk. Miután az összes BrCN feloldódott és a pH nem változott tovább a gélt Büchner tölcséren leszürtük és mostuk 3oo ml o,1 M $NaHCO_3$-tal 293 K-en.
Az aktiválás során a gélen megjelenő gyürüs imidokarbonát csoportok nukleofil csoportokkal, mint pl. egy primer aminocsoport könnyen reakcióba lépnek s egy izouera származék keletkezik. /3.ábra/



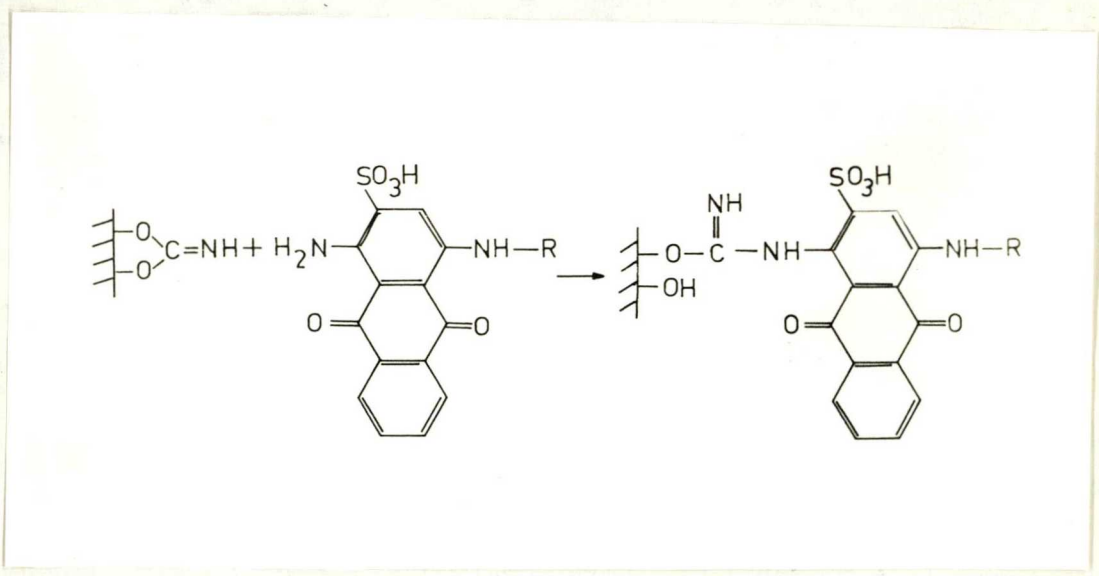
3. ábra

Sepharose 4B gél aktiválása brómciánnal

Juhász Ákos Tudományszervezési Központ SZEGED

Blue Dextrán kötése az aktivált Sepharose 4B gélen

0,4 g Blue Dextránt feloldottunk 20 ml 0,4 M Na_2CO_3-ban és a 20 ml BrCN- aktivált Sepharose 4B gélhez adtuk. A reakcióelegyet 277 K-en egy éjszakán át kevertettük. A Cibacron Blue festék molekula az antraquinon gyürüjén egy primer amino csoportot tartalmaz.
A gélhez való kötődés valószinüleg ezen keresztül történik. / 4.ábra/



4.ábra

A Blue Dextrán kötődése brómciánnal aktivált Sepharose 4B gélen.

Miután a fenti reakció lezajlott a gélt leszivattuk és 1 M NaCl-dal mostuk. Mikor az összes nem kovalensen kötött Blue Dextránt eltávolitottuk, a gélt desztillált vizzel átmostuk és hütőszekrényben tároltuk. Bakteriális fertőzés ellen 0,01 % NaN_3-ot használtunk.

A gél ligand koncentrációjának meghatározása

Kisérleteinkben a disszociációs állandó meghatározásához ismernünk kellett a gél ligand tartalmát. Ezt fotometriásan határoztuk meg. Két 1 mm-es küvettába kiülepitettük a Sepharose 4B gélt, illetve a Blue Dextránt is tartalmazó gélt, s lemértük a fényelnyelésük különbségét 615 nm-en. Igy a Cibacron Blue F3G moláris extinkciós koefficiense /E= 13600 $M^{-1}cm^{-1}$/ ismeretében az általunk készitett gél festéktartalma 7 x 10^{-4}M volt. Ez az érték jól egyezik a visszamérés alalpján / az összes bevitt és a nem kötődött Blue Dextrán mennyiség különbségeként/ meghatározott koncentrációval.

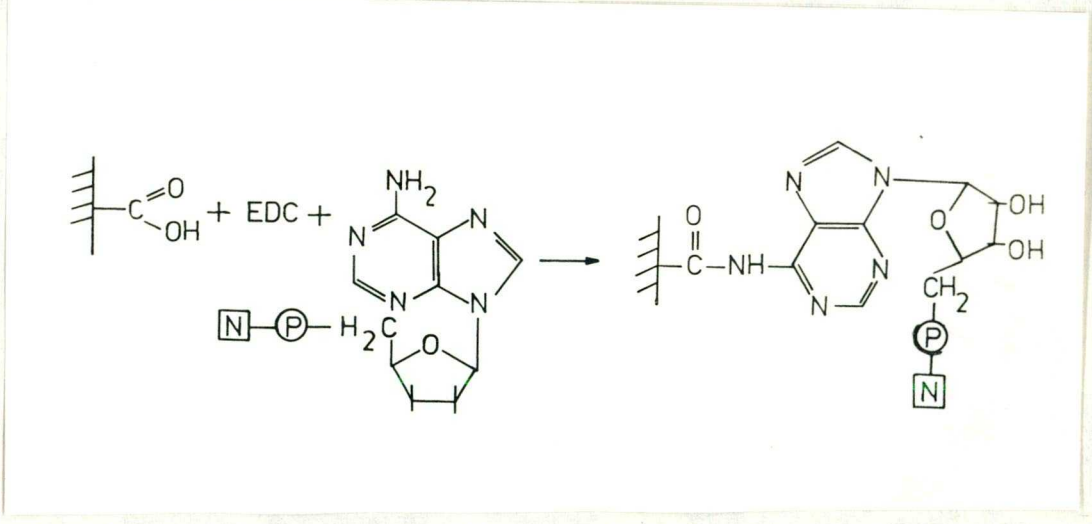
A gél effektiv ligand koncentrációjának meghatározása

A gél ligand koncentrációjaként nem a 7 x 10^{-4}M értékkel számoltunk, hanem meghatároztuk a gél effektiv ligand koncentrációját, a következő módon: a Blue Dextrán Sepharose 4B gélt batch rendszerben telitettük GAPD-vel. Mértük az igy telitett gél és a tiszta Blue Dextrán Sepharose 4B gél fényelnyelésének különbségét 660 nm-en, s a komplex moláris extinkciós koefficiense ismeretében

/E= 4300 $M^{-1}cm^{-1}$/ meghatároztuk a gél effektiv ligand koncentrációját. Ez a 4 x 10^{-4}M-nak adódott.

NAD immobilizálása CH-Sepharose 4B gélre

Az affinitás szorbens készitéséhez a Pharmacia gyár által forgalmazott CH-Sepharose 4B gélt alkalmaztuk. A gél heptánkarbonsav oldalláncokat tartalmaz. A NAD immobilizálása nem közvetlenül a gél felszinére, hanem a heptánkarbonsav oldalláncokra történt mivel Lowe /197/ vizsgálatai szerint a C_6 szénláncot tartalmazó kar ideális hosszuságu , amely már elég hosszu, s még nem tud visszahajolni, ha a ligandot rákötöttük. A kar alkalmazása lehetővé teszi, hogy ne lépjen fel a gél mátrix okozta sztérikus gátlás az enzim és a ligand kölcsönhatásakor. Karbodiimidet alkalmazva kötő reagensként a kar karboxil csoportja és a NAD purin gyürüjének primer aminőcsoportja között savamid kötés jön létre.



5. ábra

NAD immobilizálása CH-Sepharose 4B gélen EDC segitségével

Az eljárás menete a következő volt: 1 g liofilizált gélt o,5 M NaCl oldatban duzzasztottunk, majd ugyanezen oldat 2oo ml-évei mostuk. A duzzasztott gél térfogata 4 ml volt. A gél pH-ját 1 N HCl-val pH 4,5-re állitottuk. A gélhez hozzáadtunk 4 ml 5 %-os EDC és 4 ml 10 %-os NAD oldatot, amelyek pH-ját előzőleg szintén pH 4,5-re állitottuk.

A reakcióelegyet szobahőmérsékleten egy éjszakán át kevertettük, majd a felüluszót leszivattuk. A gélt 1 M NaCl-dal mostuk, amig a szürletnek elnyelése volt 26o nm-en. Végül a gélt desztillált vizzel átmostuk, s vizes szuszpenzió formájában tároltuk 277 K-en.

GAPD kromatográfiája Blue Dextrán Sepharose 4B oszlopon

A Blue Dextrán Sepharose 4B oszlopot /o,6 x 24 cm/ egyensulyba hoztuk 50 mM tris/HCl pH 7,5 pufferrel. Az alegységkölcsönhatás vizsgálatánál esetenként a puffer 2 mM PGA-t tartalmazott. A kisérleteket 277 K-en végeztük.. Az oszlopot telitettük a különböző koncentrációju enzimoldatokkal. A telitést akkor értük el, mikor az eluátumban a GAPD aktivitása ugyanaz volt, mint a felvitt oldatban. Az átfolyási sebesség 4,2 ml/óra, a frakciók térfogata 1,4 ml volt. A nem kötődött enzimet két oszloptérfogat pufferrel mostuk, amely esetenként szintén 2 mM PGA -t tartalmazott. A megkötött fehérjét lineáris NAD-gradienssel eluáltuk. A gradienst 3o ml pufferrel és 3o ml 10 mM NAD-ot tartalmazó pufferrel készitettük. Az elució során

a kiindulási enzimaktivitás több, mint 95 %-át visszakaptuk. Kontroll kisérletek szerint a GAPD nem tud kötődni a Sepharose 4B oszlopon.

GAPD és aldoláz együttes kromatográfiája Blue Dextrán Sepharose 4B oszlopon

Ezeket a kisérleteket hasonló módon hajtottuk végre, mint a fentieket. A különbségek a következők voltak:

1/ a Blue Dextrán Sepharose 4B oszlopra aldoláz és GAPD elegyét vittük fel,

2/ a lineáris NAD-gradienssel történt elueiót még követte egy 1 M NaCl-os elució,

3/ a frakciókban egyaránt mértünk aldoláz és GAPD aktivitást.

GAPD kötődése Blue Dextrán Sepharose 4B gélen egyensulyi batch rendszerben

A kisérleteket 277 K-en 5o mM tris/HCl pH 7,5 pufferben végeztük. 0,2-0,5 ml Blue Dextrán Sepharose 4B gél szuszpenziót/17 ml ülepitett gél 25 ml végtérfogatban/ töltöttünk kémcsövekbe és ehhez 0,5 -10,0 ml enzimoldatot /10^{-5}-10^{-7}M/ adtunk.

A csöveket az egyensuly beálltáig kevertettük, azaz amikor az enzim aktivitása a felüluszóban nem változott tovább. Ez három óráig tartott. Ekkor a szuszpenziót ülepedni hagytuk és mértük a felüluszó enzimaktivitását. Kontroll kisérletekben az enzimoldatot hasonló higitásban gél nélkül kevertettük azonos körülmények között és három óra után mértük az aktivitást.

GAPD szorpciója NAD-Sepharose 4B gélen aldoláz jelenlétében

A kisérleteket 50 mM tris/HCl pufferben végeztük, változtatva a puffer pH-ját, illetve a hőmérsékletet. A kémcsövekbe 0,3 - 0,5 ml NAD-Sepharose 4B gélt /10 ml ülepitett gél 20 ml végtérfogatban/ és 0,5 -0,5 ml GAPD /10^{-5}M/, illetve aldoláz /10^{-5}M/ oldatot mértünk be. A csöveket időnként rázogatva három órán át /239 K felett két órán át/ inkubáltuk. Az egyensuly beállta után a kiülepedett szuszpenzió felüluszójából mértük az enzimek aktivitását.

A kontroll kisérletek a következők voltak:

1/ a gélhez csak GAPD oldatot adtunk,

2/ a gélhez csak aldoláz oldatot adtunk,

3/ a GAPD-t kevertettük /azonos koncentrációban, pH-n és hőmérsékleten/ gél nélkül,

4/ az aldolázt kevertettük gél nélkül hasonló módon,

5/ Az aldoláz és a GAPD elegyét kevertettük gél nélkül.

József Attila Tudományegyetem Központi Könyvtára SZEGED

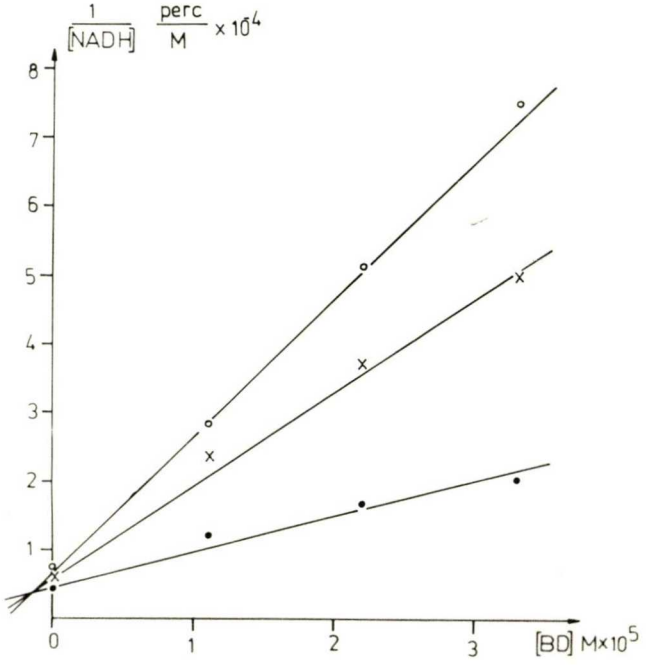
IV.

KISÉRLETI RÉSZ

A./ A GAPD alegységei közötti kölcsönhatás vizsgálata

A GAPD és a Blue Dextrán közötti kölcsönhatás jellege

A GAPD alegységei közötti kölcsönhatás vizsgálatára Blue Dextrán Sepharose 4B gélt alkalmaztunk. Az irodalomban a Blue Dextrán /illetve maga a Cibacron Blue F3G/ és az enzimek közötti kölcsönhatásra adott magyarázatok ellentmondásosak. Vizsgáltuk, hogy a GAPD esetében a Blue Dextránon való kötődés specifikusnak tekinthető-e, vagy sem, azaz valóban nevezhető-e affinitás szorbensnek a Blue Dextrán a GAPD szempontjából. A kérdés eldöntésére reakciókinetikai méréseket alkalmaztunk. Az apo-GAPD-vel végzett kisérletekben különböző NAD és Blue Dextrán koncentrációnál mértük a GAPD katalizálta reakció sebességét. Az eredményeket Dixon szerint ábrázoltuk. /6.ábra/
A mérések alapján megállapitható, hogy a Blue Dextrán a GAPD-nek a NAD-ra nézve kompetitiv inhibitora. Ez azt jelenti, hogy a festék molekula feltehetően a NAD-kötő helyhez kapcsolódik a GAPD aktiv centrumában. Az enzim inhibitor komplex disszociációs állandója a fenti mérések szerint $K_i = 10^{-6}$M. Ez a K_i érték egy viszonylag szoros kötést jelent, s igy lehetőség nyilott arra, hogy az immobolizált Blue Dextrán és a GAPD kölcsönhatását széles fehérje koncentráció tartományban vizsgálhassuk.



6. ábra

A GAPD katalizálta reakció gátlása Blue Dextránnal Dixon szerinti ábrázolásban./GAPD/:1 x 10^{-8}M. Az aktivitásmérés 298 K-en történt.

——o—— 7 x 10^{-5}M NAD

——x—— 9 x 10^{-5}M NAD

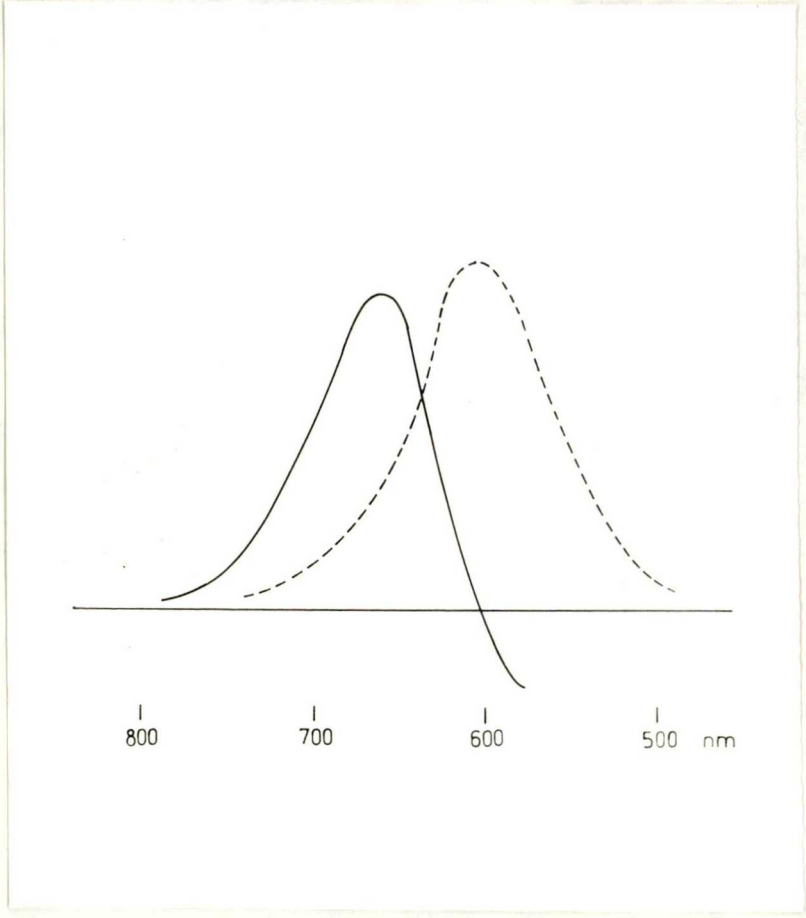
——•—— 1 x 10^{-4}M NAD

A GAPD-Blue Dextrán komplex sztöchiometriájának vizsgálata

A kinetikai kisérletek eredményeit megerősitették a spektrofotometriás mérések, ahol a GAPD és a Blue Dextrán közötti kölcsönhatás sztöchiometriáját vizsgáltuk. A festékmolekula 610 nm-nél megjelenő elnyelési sávja enzim jelenlétében eltolódik a magasabb hullámhosszak felé. Az enzim-festék komplex differencia spektrumának maximuma 660 nm-nél jelenik meg. /7. ábra/ Hasonló jelenséget figyelt meg Thompson /1976/ az LDH és a festék között kialakult komplexnél is.

A tetramer enzim /apoenzim és holoenzim/ és a Blue Dextrán közötti kölcsönhatásra jellemző differencia spektrum maximumán növekvő Blue Dextrán koncentrációnál mértük a fényelnyelés változását. /8. ábra/ Az enzim teljes telitésénél mért extinkciáváltozásból számolt extinkciós koefficiens E= 43oo $M^{-1}cm^{-1}$-nek adódott. 66o nm-nél. Az apoenzimre mért adatokat Wu és Hammes szerint /1973/ ábrázolva töréspont nélküli egyenest kaptunk, amely arra utal, hogy az általunk alkalmazott Blue Dextrán kötődés szempontjából homogénnek tekinthető, ellentétben az irodalomban közölt egyes adatokkal. /Weber, 1979/.

A Blue Dextrán és a GAPD közötti kölcsönhatás egyetlen disszociációs állandóval jellemezhető /K_d= 4,8 x 10^{-5}/, amely az egyenes meredekségéből határozható meg. A telitésből nyert K_d érték nagyobb, mint a kinetikailag meghatározott K_i, amely tulajdonképpen szintén az enzim és a

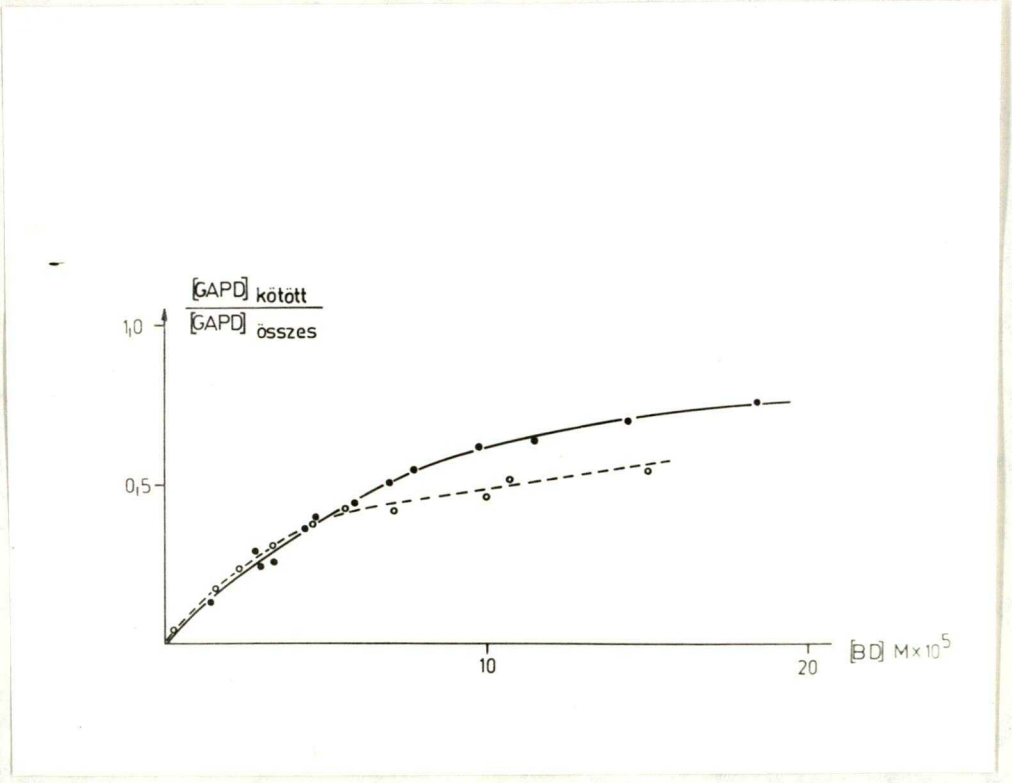


7. ábra

A Blue Dextrán spektruma - - - - - - -

a GAPD-Blue Dextrán komplex differencia spektruma ———— 55o - 8oo nm hullámhossz tartományban.

József Attila Tudományegyetem Központi Könyvtára SZEGED



8.ábra

GAPD telitése Blue Dextránnal. A méréseket 660 nm-en 298 K-en végeztük.

1 x 10^{-5}M apo-GAPD ————————,

1 x 10^{-5}M holo-GAPD - - - - - - - -

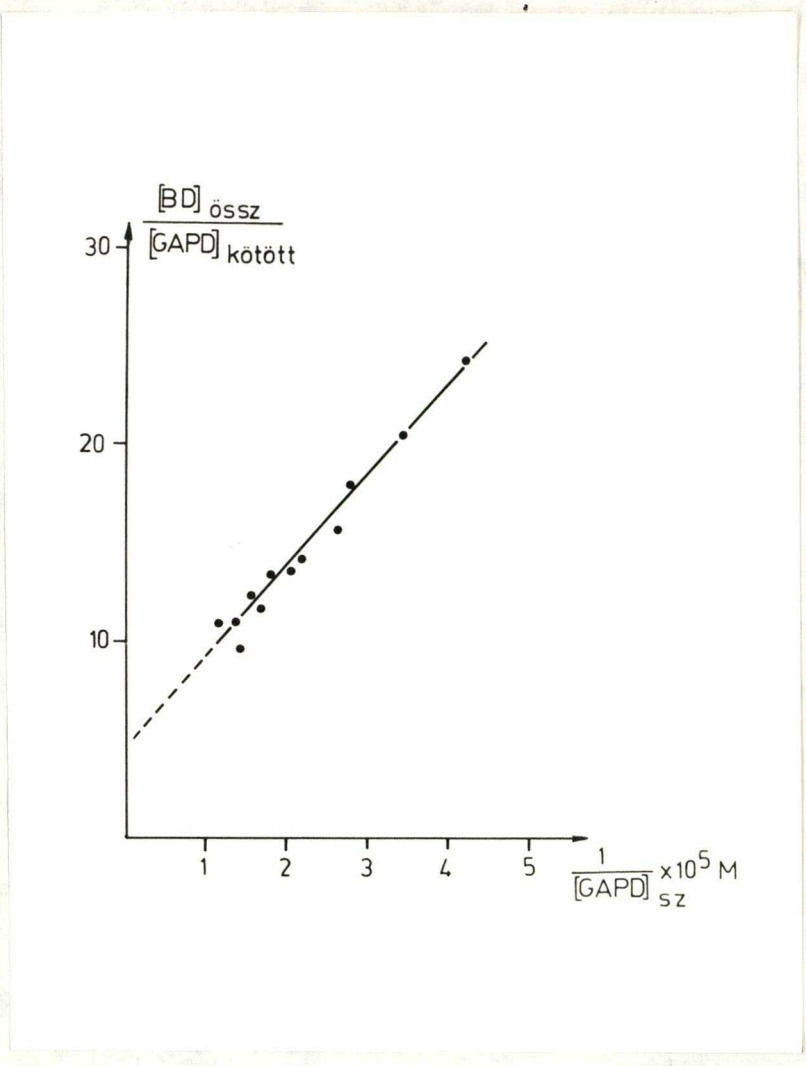
Blue Dextrán komplexének disszociációs állandója. Ennek oka feltehetően az, hogy a két kisérletben az enzim koncentrációja nagyságrendileg különbözött, s mint az a későbbi kisérleteinkből kiderült a Blue Dextrán és a GAPD közötti komplex disszociációs állandója erősen függ az enzim koncentrációjától. A telitési kisérletben nyert adatok Wu-Hammes szerinti ábrázolása lehetőséget nyujt a kölcsönhatás sztöchiometriájának meghatározására. Az egyenes az ordináta tengelyt ~4-nél metszi, s ez azt mutatja, hogy a GAPD alegységeként egy Blue Dextránt képes megkötni./9. ábra/

Ha a holó-GAPD', amely 2,5 mol NAD-ot tartalmaz tetramerenként, és a festék kölcsönhatását vizsgáljuk, a kötőhelyek csaknem a felét ugyanugy telithetjük, mint az apoenzimnél /8.ábra/. A további kötőhelyek és a Blue Dextrán közötti kölcsönhatást az ott szorosan kötött NAD-ok gátolják.

A GAPD és Blue Dextrán közötti kölcsönhatás függése a GAPD koncentrációjától

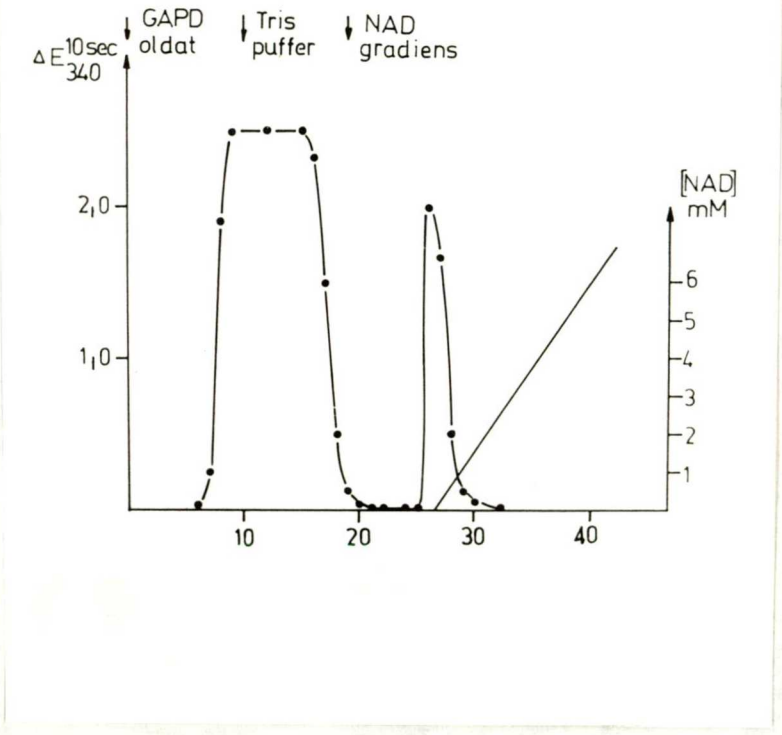
A holo-GAPD, amely 2,5 mol NAD-ot tartalmazott tetramerenként szorpcióját vizsgáltuk Blue Dextrán Sepharose 4B oszlopon, különböző enzimkoncentrációnál. A kisérlet sémája a 10. ábrán látható.

Az oszlopot az adott koncentrációju GAPD oldattal telitettük, a amikor a felvitt és a kifolyó oldatban a GAPD aktivitása megegyezett, az oszlopot mostuk két oszloptérfogat pufferrel, majd a megkötődött enzimet lineáris NAD-gradienssel /1-4mM/ eluáltuk.



9. ábra

GAPD telitése Blue Dextránnal Wu-Hammes szerint ábrázolva. /apo-GAPD/: 1 x 10^{-5}M. A tengelymetszet a GAPD-n levő Blue Dextrán-kötőhelyek számát adja meg.



10. ábra

GAPD affinitáskromatográfiája Blue Dextrán Sepharose 4B oszlopon 277 K-en. Az oszlop méretei: o,6 x 24 cm. Átfolyási sebesség: 4,2 ml/óra. Frakciótérfogat 1,3, ml. A kisérletet 5o mM tris/HCl pH 7,5 pufferben végeztük. A GAPD aktivitását o,1 ml mintával 3,o ml reakciótérfogatban mértük, s $E_{340}^{10\ sec}$ egységekben fejeztük ki.

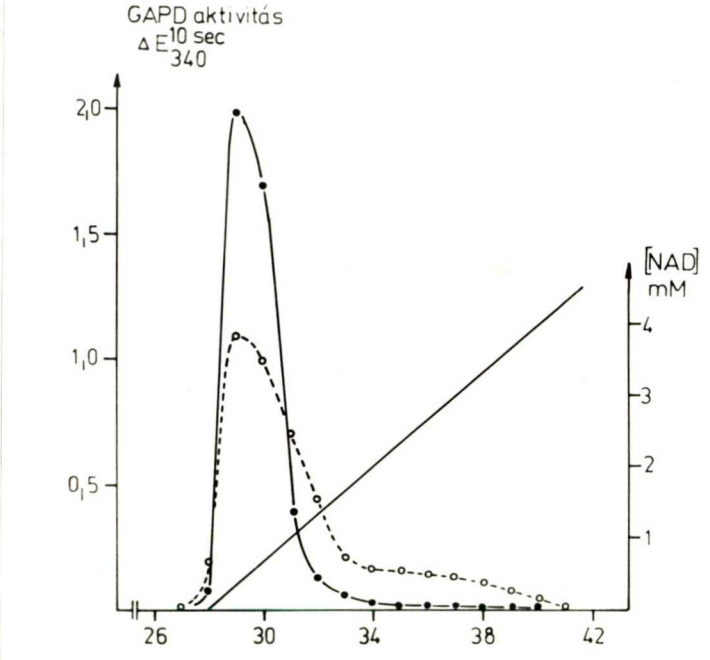
A kisérlet végén az oszlopot 1 M NaCl-os és pufferes mosással regeneráltuk. A NAD-dal eluált enzim mennyiségét azonosnak vettük az oszlopon az egyensulyban megkötött enzimmel. Ez csak közelitőleg igaz, hiszen a pufferes mosás során deszorpció is bekövetkezik, mivel az oldatban a szabad enzim koncentrációja lecsökken. A pufferes mosás során azonban az oszlopról eluálódott enzimet, aktivitásméréssel nem lehet kimutatni, azaz a GAPD koncentrációja ezekben a frakciókban elenyésző. A NAD-dal eluált GAPD mennyiségét tehát, ha nem is azonosnak, de mindenesetre arányosnak vehetjük az oszlopon megkötött enzim mennyiségével.

Az oszlopra 10^{-5}-10^{-7}M GAPD oldatot vittünk fel. Az eluciós profilok a 11. 12. és 13. ábrákon láthatók. A kromatográfiás adatokból számolt közelitő disszociációs állandó függ a GAPD koncentrációtól, mégpedig kisebb enzim koncentrációnál viszonylagosan több kötődik az oszlopon, azaz a K_d csökken. A disszociációs állandót az alábbi módon számoltuk:

$$K_d = \frac{/GAPD/_{telitési} \times /B.D./_{szabad}}{/GAPD/\ eluált}$$

ahol $/GAPD/_{telitési}$ jelenti azt a GAPD koncentrációt amellyel az oszlopot telitettük a $/B.D./_{szabad}$ a Blue Dextrán koncentráció és az oszlopról eluált kötött GAPD koncentrációjának különbsége , és a /GAPD/eluált a kötött GAPD menynyiség és az oszlop térfogatának hányadosa.

SZEGED



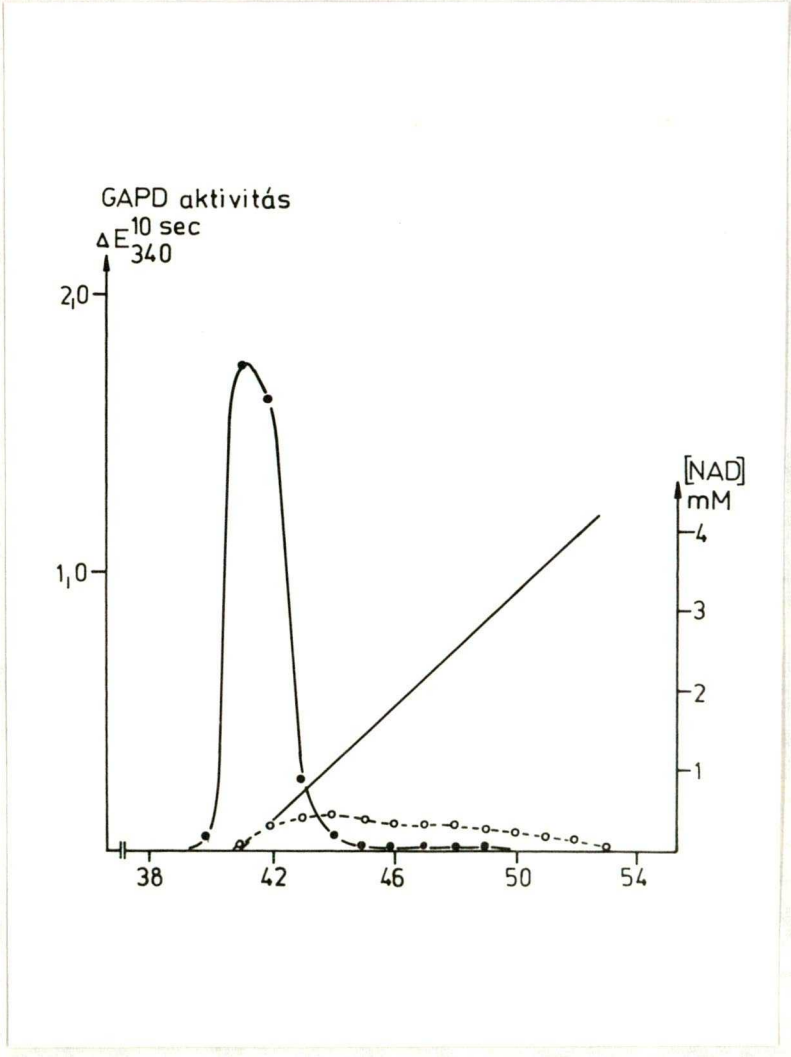
11. ábra

GAPD elúciója Blue Dextrán Sepharose 4B oszlopról lineáris NAD-gradienssel 2 mM PGA jelenlétében ————————, PGA nélkül - - - - - - - - - - - - -

/GAPD/: 1 x 10^{-5}M. A kromatográfiás adatokból számolt disszociációs állandók:

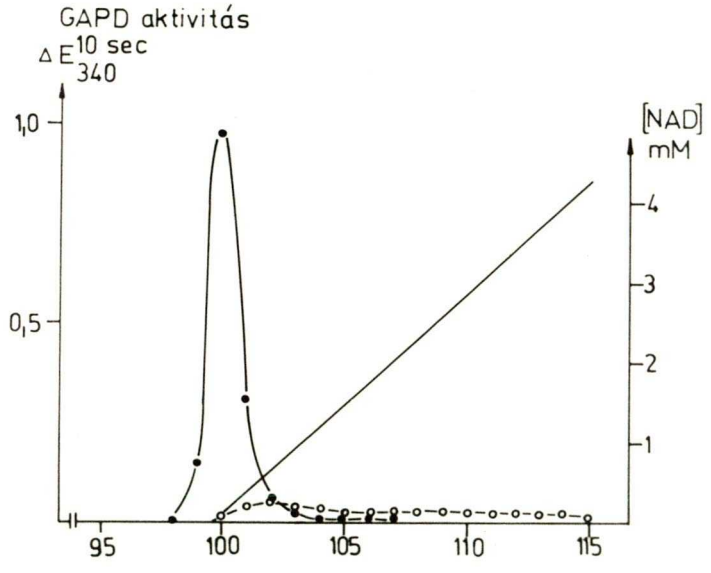
PGA jelenlétében: 2,4 x 10^{-3}M,

PGA nélkül: 2,1 x 10^{-3}M.



12. ábra

GAPD eluciója Blue Dextrán Sepharose 4B oszlopról lineáris NAD-gradienssel 2 mM PGA jelenlétében————————,
PGA nélkül - - - - - - - -
/GAPD/: 1×10^{-6}M. A kromatográfiás adatokból számolt disszociációs állandók: PGA jelenlétében $4,4 \times 10^{-4}$M
PGA nélkül $1,6 \times 10^{-3}$M.



13. ábra

GAPD elúciója Blue Dexxtrán Sepharose 4B oszlopról lineáris NAD-gradienssel 2 mM PGA jelenlétében ——————
PGA nélkül - - - - - - -
/GAPD/: 1 x10^{-7}M. A kromatográfiás adatokból számolt disszociációs állandók: PGA jelenlétében 7,2 x 10^{-5}M,
PGA nélkül 4,4 x 10^{-4}M.

A fenti kisérletsorozatot megismételtük 2 mM gliceraldehid 3-foszfát jelenlétében, s azt tapasztaltuk, hogy adott telitési enzim koncentráció mellett a szubsztrát jelenlétében több enzim kötődik az oszlopon, mint annak távollétében, azaz a K_d értéke kisebb. A látszólagos disszociációs állandó itt is csökken az enzim koncentráció csökkenésével.

A 11. 12. 13. ábrákon látható, hogy az eluciós profilok is különböznek a 2 mM PGA jelenlétében ill. anélkül. végzett kromatográfia során. PGA jelenlétében az enzim kisebb, mint 10^{-4}M NAD-dal már eluálható, s egy éles csucsot ad, mig a szubsztrát távollétében a kötött enzim jelentős része csak 1 mM NAD koncentrációnál eluálódott az oszlopról.

Batch rendszerben végzett kisérletek szerint a GAPD és a NAD Sepharose 4B gél közötti komplex disszociációs állandója csökken a GAPD koncentráció csökkenésével.

Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a GAPD koenzim kötőhelyei különböznek attól függően, hogy az enzim tetramer vagy dimer/monomer formában van-e jelen, s hogy a PGA szubsztrát jelen van-e, vagy sem.

<u>A GAPD-Blue Dextrán komplex disszociációs állandójának meghatározása egyensulyi batch rendszerben</u>

A kromatográfiás kisérletek során az enzim-festék komplex disszociációs állandójára kapott érték csak közelitő érvényünek fogadható el, ezért a kromatográfia során alkalmazott feltételek között megismételtük a kötődési vizsgálatokat

egyensulyi batch rendszerben. A különböző koncentrációju enzim oldatokat a kisérleti részben leirt arányok szerint kevertettük Blue Dextrán Sepharose 4B géllel. Az egyensulyi méréseket megismételtük PGA jelenlétében is. Az egyensuly beállta után a nem kötött enzim koncentrációját a felüluszóban aktivitásméréssel határoztuk meg. A rendszerben levő összes enzim koncentrációja / a megfelelő higulásokat is figyelembe véve/ és a gél kiindulási ligand koncentrációja ismert. Ezekből az adatokból az egyensulyban a gélen megkötődött enzim koncentrációja, s ezzel együtt már a komplex disszociációs állandója is meghatározható.

A GAPD-Blue Dextrán Sepharose 4B komplex látszólagos disszociációs állandóját az alábbi egyenlet szerint határoztuk meg:

$$K_d = \frac{\left(/L/_{össz} - /E/_{kötött}\right) \times /E/_{szabad}}{/E/_{kötött}}$$

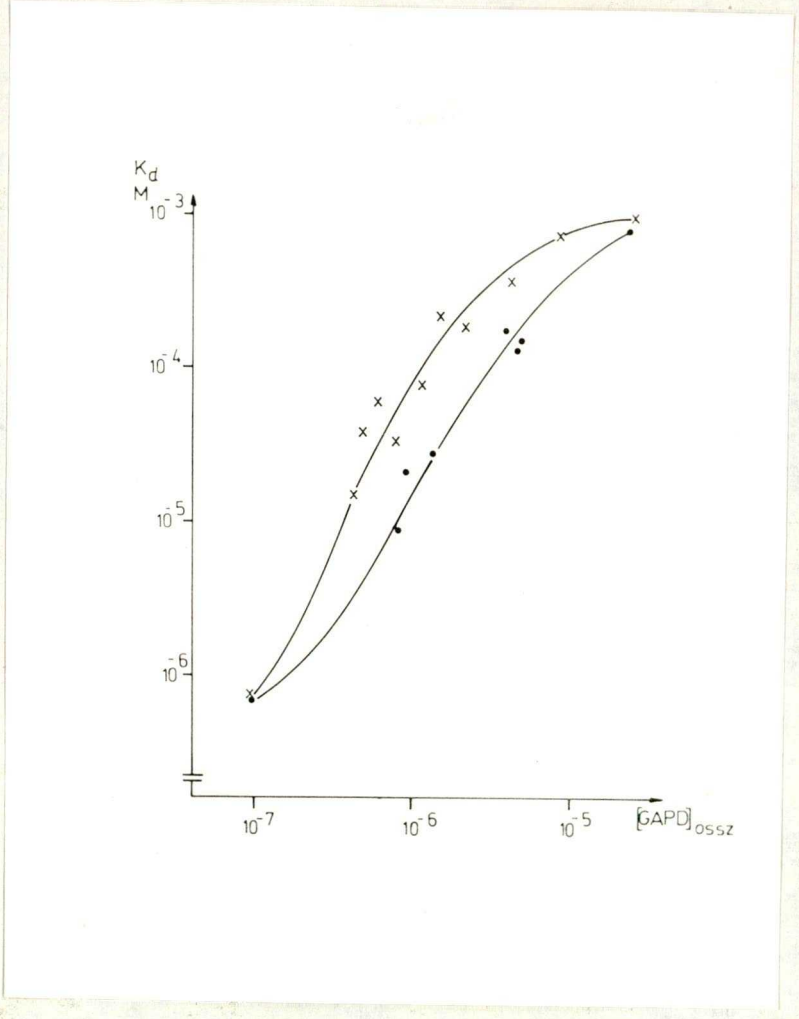
ahol $/E/_{szabad}$ a nem kötött enzim koncentrációja, amit aktivitásméréssel határoztunk meg a felüluszóban

$/L/_{össz}$: az immobilizált festék effektiv koncentrációja

$/E/_{kötött}$: a gélen kötött enzim koncentrációja

A fenti kisérletsorozatban nyert eredmények a 14. ábrán láthatók. A GAPD-Blue Dextrán komplex disszociációs állandója erősen függ az enzimkoncentrációtól. A GAPD koncentrációjának csökkenésével a disszociációs állandó csökken. Ha a holo-GAPD helyett apoenzimet használtunk, hasonló lefutásu görbét kaptunk a K_d-/E/ függvényre.

József Attila Tudományegyetem Központi Könyvtára SZEGED



14. ábra

A GAPD-Blue Dextrán komplex disszociációs állandójának függése a GAPD koncentrációjától, egyensulyi batch rendszerben meghatározva.

—•— 2 mM PGA jelenlétében

—x— PGA nélkül

Az enzim-ligand komplex látszólagos disszociációs állandójában bekövetkezett változás oka lehet akár az immobilizált ligand, akár az enzim inhomogenitása. Méréseink szerint /9, ábra/ a dextránhoz kötött kromofór homogénnek tekinhető. A tetramer GAPD-ben az alegységek között nincsenek kovalens kötések, igy képes dimerekre, ill. monomerekre disszociálni/Hoagland,1969., Lakatos, 1972./

Az enzim koncentrációjának csökkentése kedvez a tetramer disszociálásának, ezért az enzim-ligand disszociációs állandójában bekövetkező csökkenés oka feltehetőleg a disszociált formák - dimer és / vagy monomer - megjelenése a rendszerben. Ez azt jelenti, hogy az enzim disszociált formája jobban képes kötődni a Blue Dextránon. Ez feltehetőleg azzal magyarázható, hogy a disszociáció következtében megváltozik.a NAD-kötő fehérjerész konformációja.

A 2 mM PGA jelenlétében végzett kisérletekben a disszociációs állandó szintén csökken az enzim köncentráció csökkenésével, sőt PGA jelenlétébe a K_d koncentráció függése még nagyobb. A 2 mM PGA-nak a disszociációs állandóra gyakorolt hatása 10^{-6}M enzim koncentrációnál a legkifejezettebb. Alacsony /10^{-8}M/ és magas /10^{-4}M/ enzim koncentrációnál gyakorlatilag nincs különbésg az enzim festék komplex disszociációs állandójában a PGA jelenlétében ill. anélkül végzett kisérletekben.

Ez kizárja annak lehetőségét, hogy a PGA hatása az enzim gél közti kölcsönhatásra csak egy, az enzim konformációjában előidézett változás volna anélkül, hogy hatással lenne az enzim disszociációjára is.

Ha az egyensulyi méréseket olyan rendszerben végeztük, amely 10^{-4}M NAD-ot tartalmazott/a kromatográfiás kisérletek szerint ilyen NAD koncentrációnál az enzim már nem kötődik a gélen/ akkor 2 mM PGA koncentrációnál az enzim még nem kötődött, de tovább növelve a PGA koncentrációt a gélen megkötött GAPD mennyiség nő, azaz a K_d csökken.

A fenti kisérletek eredményei összhangban vannak az irodalomból ismert adatokkal /Ovádi, 1979./, melyek szerint a PGA kötődése eltolja a GAPD asszociációs-disszociációs egyensulyát az alacsonyabb oligomer formák felé.

A kisérletek alapján nem dönthető el, hogy ezek monomer és /vagy dimer formák-e. A GAPD-Blue Dextrán komplex egyensulyi batch rendszerben meghatározott disszociációs állandója alacsony enzim koncentrációnál, ahol független a PGA koncentrációtól, $K_d = 7 \times 10^{-7}$M /14.ábra/, ami jól egyezik a kinetikai mérésekben nyert K_i-vel./ Ezek alapján valószinü, hogy a 10^{-6}M körüli K_d érték a disszociált formának a Blue Dextránhoz való affinitást jellemzi.
A magas enzim koncentrációnál kapott $K_d = 10^{-3}$M érték feltehetően a tetramer GAPD-Blue Dextrán kölcsönhatásra jellemző.

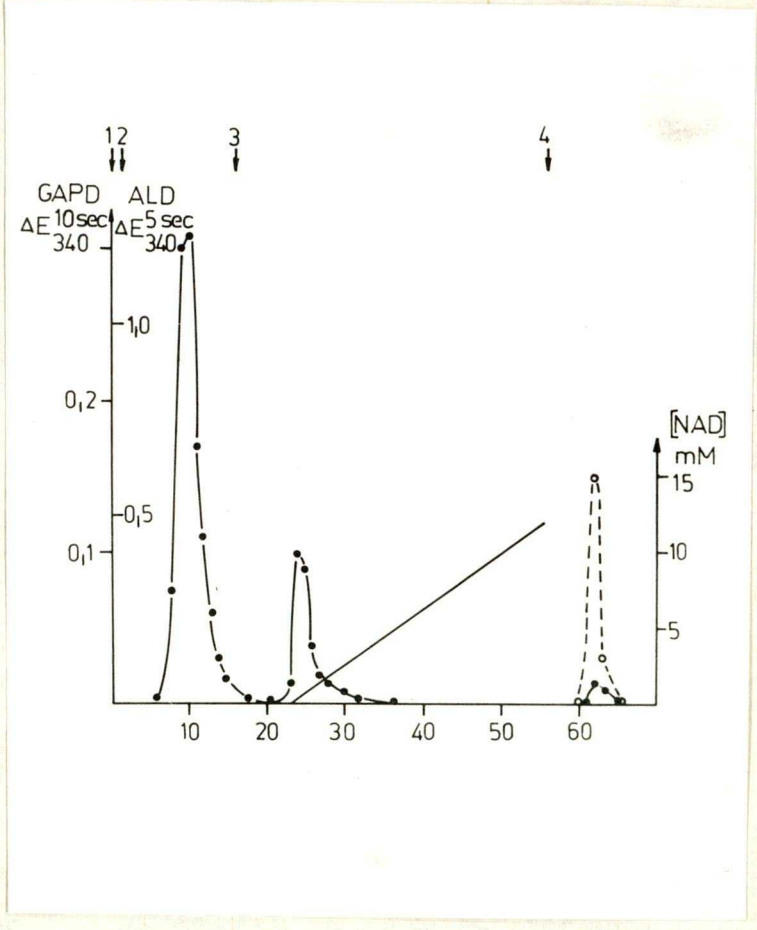
Tehát a GAPD NAD-kötő helyeinek affinitása függ az enzim disszociációs állapotától.

B . Az aldoláz és a GAPD közötti kölcsönhatás vizsgálata

Aldoláz és GAPD együttes kromatográfiája Blue Dextrán Sepharose 4B oszlopon

A GAPD affinitáskromatográfiáját aldoláz jelenlétében végezve az előzőektől eltérő eredményeket kaptunk. Az itt nyert kromatogramm a 15. ábrán látható. Az oszlopra a GAPD és az aldoláz elegyét vittük fel. A pufferes mosás után lineáris NAD gradienssel/0-10mM/, majd 1 M NaCl-ot tartalmazó pH 7,5 tris/HCl pufferrel mostuk az oszlopot. A frakcióban mértük az aldoláz és a GAPD aktivitását. A pufferes elucióval a nem kötődött GAPD-t és aldolázt távolitottuk el az oszlopról, a NAD-gradienssel nyert frakciók csak GAPD-t tartalmaztak. Ez arra utal, hogy bár a Blue Dextrán festék molekulája a Cibacron Blue F3G képes kölcsönhatásba lépni az aldolázzal, a kötődésért felelős szerkezeti egység nem tekinthető szigoru értelemben vett "dinukleotid fold"-nak, csak ahhoz hasonlónak, hiszen a NAD-ot nem képes az enzim megkötni. Az oszlopon megkötődött aldolázt 1 M NaCl-dal szoritottuk le. Ezen frakciókban az aldoláz mellett a GAPD is megjelent.

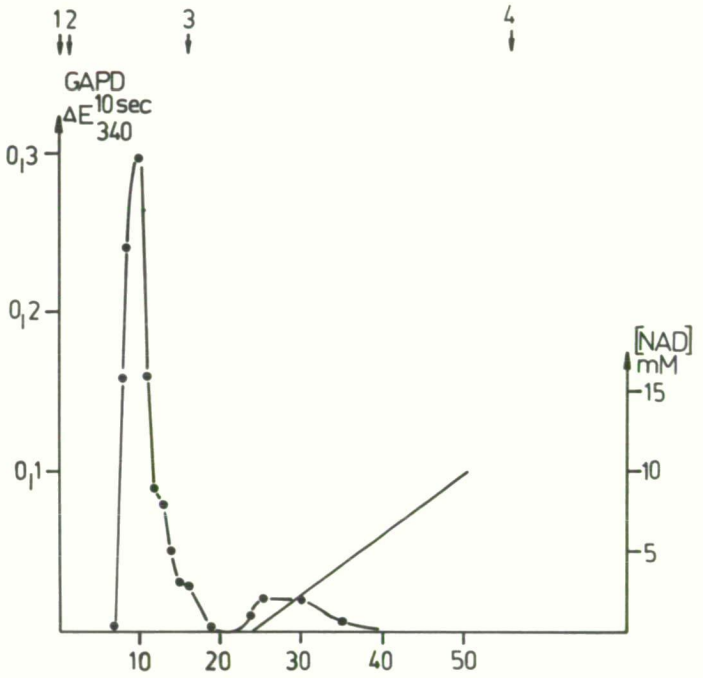
Ha csak GAPD-t kromatografáltunk az oszlopon az enzim a NAD-os elucióval visszanyerhető, s az azt követő 1 M NaCl-os mosással már nem eluálható GAPD./ 16.ábra/



15. ábra

GAPD és aldoláz együttes kromatográfiája Blue Dextrán Sepharose 4B oszlopon.

1. 2,3 x 10^{-5}M GAPD-t és 4,4 x10^{-5}M aldolázt tartalmazó oldat felvitele az oszlopra
2. 5o mM tris/HCl pH 7,5 puffer
3. NAD-gradiens /35 ml tris/HCl pH 7,5 puffer és 35 ml 2o mM NAD/
4. 1 M NaCl



16. ábra

GAPD kromatográfiája Blue Dextrán Sepharose 4B oszlopon

1. $2,3x10^{-5}$M GAPD felvitele az oszlopra
2. 5o mM tris/HCl pH 7,5 puffer
3. Lineáris NAD-gradiens /35 ml tris/HCl puffer, és 35 ml 20 mM NAD/
4. 1 M NaCl

A két kromatográfia eredményét összevetve megállapitható, hogy a GAPD képes az aldolázon keresztül is kötődni a Blue Dextrán oszlopon, azaz a két enzim kölcsönhatásba lép egymással.

A kölcsönhatás kvantitativ jellemzésére azonban ezzel a módszerrel nyert adatokat nem tudtuk felhasználni, ugyanis a hosszú elució során valószinüleg az aldolázon kötött GAPD egy része már eltávozott. Ezért a K_d meghatározására itt is egyensulyi batch technikát alkalmaztunk.

Az aldoláz és a GAPD közötti komplex disszociációs állandójának meghatározása

A komplex disszociációs állandójának meghatározására egyensulyi batch módszert alkalmaztunk. Blue Dextrán Sepharose 4B géllel végezve a kisérletet a rendelkezésre álló adatokból / az enzimek aktivitásai a felülúszóban az egyensulyi helyzetben/ nem tudtuk a K_d-t meghatározni. Ezen a gélen mind az aldoláz, mind a GAPD meg tud kötődni, továbbá a GAPD meg tud kötődni a ligandon már megkötődött aldolázon keresztül is, s esetleg hasonló módon az aldoláz is az oszlopon levő GAPD-n keresztül,

A gélen megkötött enzimek két különböző tipusu kötésben vehetnek részt, amelyek arányát az emlitett egyetlen, a felülúszóban mért aktivitással meghatározni nem tudtuk. Ezért olyan affinitás szorbenst kerestünk, amelyen csak az egyik enzim képes megkötődni.Az immobilizált NAD-ot tartalamzó gél alkalmasnak látszott erre a célra.

József Attila Tudományegyetem Központi Könyvtára SZEGED

A NAD-Sepharose 4B gél a GAPD-t, amelynek a NAD koenzime megköti, de az aldolázt nem.

Az általunk összeállitott rendszerben a következő két szimultán egyensuly áll fenn / a tetramer GAPD disszociójától eltekintünk/:

$$G + N \rightleftharpoons GN \qquad K_{GN} = \frac{/G/\,/N/}{/GN/}$$

$$G + A \rightleftharpoons GA \qquad K_{GA} = \frac{/G/\,/A/}{/GA/}$$

ahol az egyensulyi koncentrációk jelölésében a

/G/: a szabad GAPD; az /A/: a szabad aldoláz; az /N/: a gélen kötött szabad NAD koncentrációja.

K_{GN}: a gél és az enzim közötti; a K_{GA}: az aldoláz és a GAPD közötti disszociációs állandó.

A K_{GN} értékét az adott GAPD koncentráció mellett külön kisérletben határoztuk meg, ahol csak GAPD-t és gélt tartalmazott a rendszer. Az egyensulyi szabad koncentrációkat a felüluszóból mért aktivitások alapján számoltuk, a komplex koncentrációja a kiindulási és az egyensulyban mért aktivitások különbségéből adódott.

A 273 K-en végzett egyensulyi mérések szerint 4×10^{-6}M GAPD ill. aldoláz koncentrációnál a két enzim kölcsönhatására jellemző disszociációs állandó értéke 7×10^{-7}M.

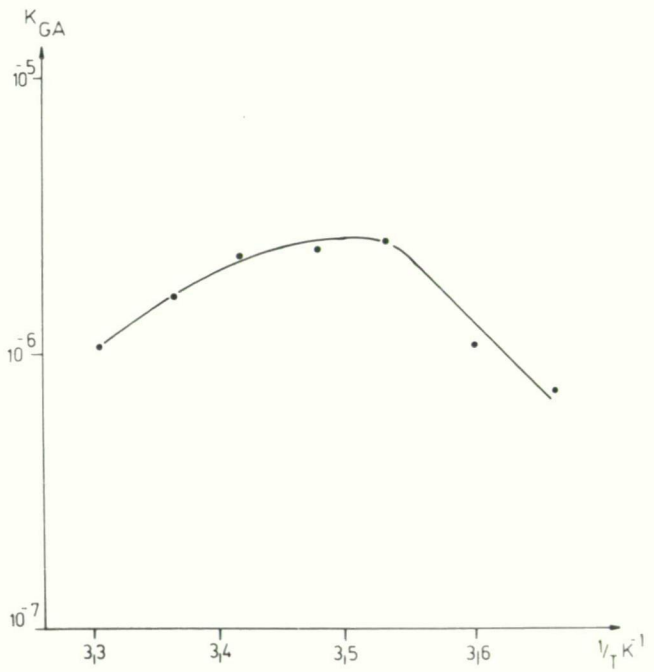
Az aldoláz a gélen már megkötött GAPD-hez nem tud kapcsolódni. Ez sztérikus okokkal nem magyarázható, mivel a Blue Dextrán Sepharose 4B oszlopon végzett kromatográfia során a GAPD megkötődött a gélen már megkötött aldolázon keresztül is./15. ábra/

Valószinübbnek tünik, hogy a GAPD konformációváltozásában keresendő a magyarázat, amelyet az immobilizált NAD-nak az enzim negyedik alegységén való kötődése idézett elő.

A NAD-CH-Sepharose 4B-t, GAPD-t és aldolázt tartalmazó egyensulyi batch rendszerben viszonylag egyszerü módon /enzim aktivitásmérés segitségével/ tanulmányozhatók a két enzim közötti kölcsönhatás kialakulásának körülményei, a kölcsönhatást befolyásoló tényezők.
A továbbiakban megvizsgáltuk a hőmérséklet és a pH hatását a két enzim komplexének kialakulására.

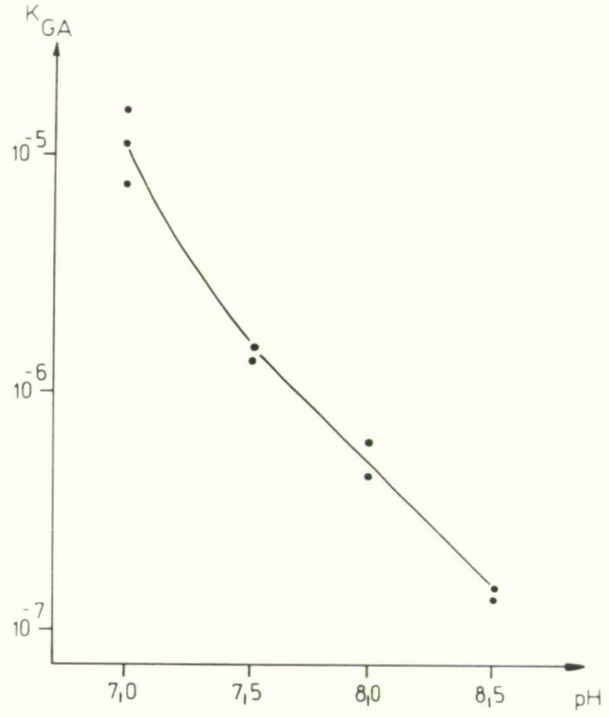
A kölcsönhatás hőmérséklet függése a 17. ábrán látható. A tris/HCl puffer pH-ja erősen függ a hőmérséklettől /hőmérsékleti koefficiense $\Delta pK_a/^oC = -0,031$/, ezért mindig az adott hőmérsékleten állitottuk be a puffer pH-ját 7,5-re. A komplex disszociációs állandója a hőmérséklet függvényében maximum görbe szerint változik. Ennek oka feltehetően az, hogy a két fehérje kölcsönhatására kapott disszociációs állandó nem egyetlen kötésre jellemző adat, hanem több kötés / amelyek lehetnek eltérő tipusba tartozók is/ egyszerre érvényesülő hatását leiró átlagérték, ahol az egyes kötések erősségének változása a hőmérséklettel eltérő jellegü.

A két enzim kölcsönhatását leiró disszociációs állandó függ a közeg pH-jától is /18.ábra/. Ez arra utal,hogy a két enzim közötti kölcsönhatásban ionos kötések is szerepet játszanak, azaz egyes aminosav oldalláncok megfelelő ionizációs állapota kell a kötés kialakitásához.



17.ábra

A hőmérséklet hatása a GAPD-aldoláz komplex disszociációs állandójára. A meghatározást egyensulyi batch rendszerben végeztük NAD-Sepharose 4B gél alkalmazásával 5o mM tris/ HCl pH 7,5 pufferben.



18.ábra

A pH hatása a GAPD-aldoláz komplex disszociációs állandójára 5o mM tris/pufferben 278 °K-on.

Azt, hogy milyen aminosav oldalláncok vesznek részt a két enzim közötti kapcsolat biztositásában a fenti eredményekből nem derithető ki. Esetleg specifikus módositások választ adhatnának a kérdésre.

Összefoglalás

Munkánk során fehérje-fehérje kölcsönhatásokat vizsgáltunk affinitás szorbensek segitségével. A kisérletek során a Blue Dextrán Sepharose 4B és NAD-Sepharose 4B géleket alkalmaztunk, amelyek közül az első kölcsönhatásba lép a GAPD-vel és az aldolázzal egyaránt, de a NAD-Sepharose 4B csak a GAPD-t köti. A szorbenseket kromatográfiás kisérletekben, valamint batch rendszerben használtuk fel. A kisérletek során két különböző tipusu enzim komplexet tanulmányoztunk. A GAPD alegységei közötti kölcsönhatást vizsgálva megállapitottuk, hogy a PGA szubsztrát eltolja az enzim asszociációs-disszociációs egyensulyát a disszociáció irányába.

Tanulmányoztuk az aldoláz és a GAPD között kialakuló komplexeket. Meghatároztuk a komplex disszociációs állandóját, valamint annak függését a hőmérséklettől és a pH-tól. Az általunk meghatározott disszociációs állandó /7×10^{-7}M/ nagyságrendileg megegyezik az irodalomból ismert disszociációs állandóval /$2{,}5 \times 10^{-7}$M, Ovádi,1979./

A disszociációs állandót egyensulyi batch rendszerben végzett mérésekből határoztuk meg. Ez a módszer nem csak fehérje-fehérje kölcsönhatások vizsgálatára alkalmas, hiszen ha két, egymással komplexet alkotó biomolekula, legyen az fehérje, nukleinsav, lipid, szénhidrát stb. bármelyikére tudunk találni olyan affinitásszorbenset, amely a másik molekulát nem képes kötni, a fenti egyensulyi módszerrel a komplex disszociációs állandója megadható.

A módszer alkalmazhatóságának kritériuma, hogy ha "A" és "B" molekula komplexet alkot és "A" tud kötődni egy szorbensen, akkor a "A" megoszlása a "B" és a szorbens között összemérhető legyen, azaz vagy legyen a két disszociációs állandó közeli érték, vagy a koncentrációarányokat válasszuk meg ugy, hogy a feltétel teljesüljön.

E módszer előnye a más szerzők által leirt kisérleti eljárásokkal szemben az, hogy egyszerü laboratóriumi körülmények között lehetővé teszi a biomolekulák közötti kölcsönhatás kvantitativ vizsgálatát, valamint vizsgálható bármelyik harmadik anyag, továbbá a hőmérséklet, a pH, az ionerősség, a közeg dielektromos tulajdonságának hatása a komplex kialakulására.

Rövidítések

GAPD: gliceraldehid 3-foszfát dehidrogenáz

PGA : gliceraldehid 3-foszfát

DPGA: glicerinsav 1,3-difoszfát

FDP : fruktóz 1,6-difoszfát

NAD : nikotinsavamid adenin dinukleotid

AMP : adenozin monofoszfát

P_i : szervetlen foszfát

LDH : tejsav dehidrogenáz

tris: tris-hidroximetil aminometán

Attila József Tudományegyetem Könyvtára SZEGED

VII. IRODALOMJEGYZÉK

Backman, L., Shanbag, V. /1976/ FEBS Lett., 65. 39.

Beissner, R.S., Quiocho, F.A., Rudolph, F.B. /1979/ J. Mol. Biol. 134.847.

Chaiken, I.M. /1979/ Anal. Biochem. 97.1.

Chan, W.W.-C. /1976/ Can. J. Biochem. 54. 521.

Churchich, J.E. /1978/ Biochem. Biophys. Res. Commun. 83. 1105.

Clarke, F.M., Masters, C.J. /1973/ Biochim. Biophys Acta 327. 223.

Cuatrecasas, P., Anfinsen, C.B. /1971/ Methods in Enzymology /Jakoby, W.B. ed./ Vol. 22. 345. Academic Press, New York

Danner, J., Somerville, J.E., Turner, J., Dunn, B.M. /1979/ Biochemistry 18. 435.

Dubinyin, N.P. /1963/ Molekuljarnaja genetyika igyejsztvije izlucsenyij na naszledsztvennoszty 13. Moszkva

Elődi, P., Szörényi, E.T. /1956/ Acta Physiol. Acad. Sci. Hung. 9. 339.

Elődi, P. /1958/ Acta Physiol. Acad. Sci. Hung. 13. 199.

Fex, G., Albertson, P.-A., Hansson, B. /1979/ Eur. J. Biochem. 99. 353.

Fox, I.B., Dandliker, W.B. /1956/ J. Biol. Chem. 281.1055.

Földi, J., Szabolcsi, G., Friedrich, P. /1973/ Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung. 8. 263.

Friedrich, P. /1975/ MTA Biol. Oszt. Közl. 18. 385.

Haff, L.A., Easterday, R.L. /1978/ Affinity techniques 23. /Sundaram ed./

Harris, J.I., Perham, R.N. /1968/ Nature /London/ 219. 1025.

Henning, U., Vogel, O., Busch, W., Flatgard, J.E. /1972/ Mosbach Colloquium 23. 343. Berlin - Heidelberg - - New York: Springer

Hoagland, V.D., Teller, D.C.Jr. /1969/ Biochemistry 8.594.

Kirschner, K., Wiskocil, R. /1972/ Mosbach Colloquium 23. 245. Berlin - Heidelberg - New York: Springer

Lakatos, S., Závodszky, P., Elődi, P. /1972/ FEBS Lett. 20. 324.

Lakatos, S., Závodszky, P. /1976/ FEBS Lett. 63. 1.

Mowbray, J., Moses, V. /1976/ Eur, J. Biochem. 66. 25.

Nichol, L.W., Ogston, A.G., Winzor, D.S., Sauyer, W.H. /1974/ Biochem. J. 134. 435.

Osborne, H.H., Hollaway, M.R. /1975/ Biochem. J. 151.37.

Ovádi, J., Salerno, C., Keleti, T., Fasella, P. /1978/ Eur. J. Biochem. 90. 499.

Ovádi, J., Keleti, T. /1978a/ Eur. J. Biochem. 85. 157.

Ovádi, J., Batke, J., Bartha, F., Keleti, T. /1979/ Arch. Biochem. Biophys. 193. 28.

Powell, J.T., Morrison, J.F. /1979/ Biochim. Biophys. Acta 568. 467.

Ryan, L.D., Vestling, C.S. /1974/ Arch. Biochem. Biophys. 16o. 279.

Schmidt, G.D., Schachman, H.K. /1973/ Biochemistry 12.3789.

Stellwagen, E. /1977/ Acc. Chem. Res. 1o. 92.

Stonehuerner, J., Williams, J.B., Millett, F. /1979/ Biochemistry 18. 5423.

Sumper, M., Lynen, F. /1972/ Mosbach Colloquium 23. 365. Berlin - Heidelberg - New York: Springer

Szewczuk, A., Wolny, E., Wolny, M., Baranovsky, T. /1961/ Acta Biochim. Polon. 8. 2o1.

Taylor, J.F., Green, A.A., Cori, G.T. /1948/ J. Biol. Chem. 173. 591.

Thomes, J.C., Archambault de Vencay, J., Julien, R. /1979/ Biochem. J. 185. 339.

Thompson, S.T., Cass, K.H., Stellwagen, E. /1975/ Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72. 669.

Thompson, S.T., Stellwagen, E. /1976/ Proc. Nat. Acad. Sci. USA 73. 361.

Weber, B.H., Willeford, K., Moe, J.G., Piszkiewicz, D. /1979/ Biochem. Biophys. Res. Commun. 86. 252.

Wu, C.W., Hammes, G.G. /1973/ Biochemistry 12. 14oo.

Jósef Attila Tudományegyetem Könyvtár SZEGED

Köszönetnyilvánitás

Ezuton mondok köszönetet Dr. BOROSS LÁSZLÓNAK a Biokémiai Tanszék professzorának, hogy lehetőséget teremtett doktori dolgozatom elkészitéséhez. Megköszönöm azt a figyelmet, mellyel munkámat végigkisérte, hasznos elméleti és gyakorlati tanácsait, melyekkel elősegitette munkám eredményességét.

Köszönetet mondok Dr. OVÁDI JUDITNAK, az MTA SzBK Enzimológiai Intézet tudományos főmunkatársának az igen sokoldalu elméleti és gyakorlati segitségért.

Külön szeretném köszönetem kifejezni NURIDSÁNY MIMINEK a munkám során nyujtott gyakorlati segitségért.

Köszönöm TÓTH ÉVA tudományos segédmunkatársnak és JÓNÁS ERZSÉBET tanársegédnek a dolgozat kéziratának kritikus és segitő javitását, továbbá a Biokémiai Tanszék egész kollektivájának a segitséget, melyet munkám során nyujtottak.