

A CSIRKE HIPOXANTIN-GUANIN FOSZFORIBOZIL TRANSZFERÁZ
ENZIM TISZTÍTÁSA, BIOKÉMIAI ÉS IMMUNOLÓGIAI
JELLEMZÉSE ÉS VIZSGÁLATA SEJT HIBRIDEKBEN

Doktori dolgozat

írta:

Veres Gábor

MTA

Szegedi Biológiai Központ

Genetikai Intézet

SZEGED

1983



TARTALOMJEGYZÉK

Irodalmi összefoglaló.....	1 old.	
A kísérletes munka célkitűzése.....	11	"
Anyagok és módszerek.....	12	"
Eredmények.....	17	"
Az enzim tisztítása.....	17	"
Az enzim molekulaszúlyának meghatározása.	21	"
pH függés vizsgálata	23	"
Izoelektromos pont meghatározása.....	23	"
Az enzim hőstabilitása.....	26	"
Az enzim kinetikai jellemzői.....	27	"
A konvencionális HGPRT ellenanyagok specifitása.....	30	"
Monoklonális ellenanyagok előállítása csirke agy HGPRT ellen.....	32	"
HGPRT enzim vizsgálata monoklonális ellenanyaggal sejthibridekben.....	34	"
Összefoglalás.....	36	"
Irodalomjegyzék... ..	38	"

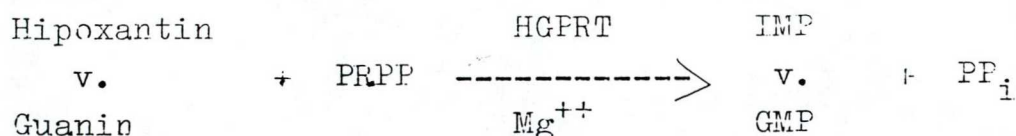
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

BSA	Marha szérum albumin
Caps	Cyklohexylaminopropan szulfonsav
CM	Karboxi-metil
DEAE	Dietilaminoetil
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Etiléndiamin tetraecetsav
GMP	Guanozin 5'-monofoszfát
IMP	Inozin 5'-monofoszfát
MES	2/N-Morfolino/etánszulfonsav
PMSF	Fenil-metil-szulfonil fluorid
PRPP	5-Foszforibozil-1-pirofoszfát
PP _i	Pirofoszfát
SDS	Nátrium lauril szulfát
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametil-etiléndiamin
Tris	Trisz/hidroximetil/aminometán

IRODALMI ÖSSZEFOGLALÓ

A hipoxantin-guanin foszforibozil transzferáz enzim /HGPRT; E.C.2.4.2.8./ a purin nukleotidok bioszintézisének egy kevésbé energia igényes, ún. mentési "salvage" reakciójának fontos enzime.

A nukleinsavak és a nukleotidok lebomlásából származó purinbázisok jelentékeny részét a gerincesek képesek újra felhasználni, és így nincs szükség a purinváz "de novo" szintézisére. Ennek a mentési reakciónak a lényege:



Ez a reakció ut lényegesen kisebb energia befektetést igényel mint a "de novo" bioszintézis.

A HGPRT enzimet és genetikai lókuszát igen régóta, és széleskörűen vizsgálják /1/. Kimutatták /2/ hogy embernél az enzim aktivitás hiány ill. csökkenése vezet a Lesch-Nyhan szindrómának nevezett /3/, veleszületett, X kromoszómához kötött anyagcsere betegséghez.

Mint jól szelektálható marker fontos szerepet játszott az emlős sejthibridek szelekciójában, és az emlős gén-expresszió tanulmányozásában.

1. A HGPRT enzim biokémiai jellemzői:

Az enzimet számos organizmusból tisztították és jellemezték: prokariótákból /4,5/, élesztőből /6,7/, egysejtűekből /8/, egér és kínai hörcsög agyból, májból és sejtkulturából /9,10/, valamint emberi vörösvértestekből /11,12,13/.

A HGPRT homogenitásig történő tisztítását a GMP-affinitás kromatográfia kidolgozása oldotta meg /10/. Az így nyert enzim poliakrilamid gélben SDS jelenlétében egy csíkot ad, amelynek molekulasúlya emlősök esetében 24 500 D; ugyanezt az eredményt kapták 6 M guanidin/HCl jelenlétében történő gélszűréssel.

Natív körülmények között az enzim tetramer, azonos alegységekkel, kb. 100 000 D molekulasúlyal. Az alegységeknek nincs enzimaktivitása, csak a natív enzim aktiv.

Kimutatták hogy az enzim nem glikozilált /12,14/ és a vörösvértestből tisztított enzimmel végzett komplett szekvencia meghatározás szerint az alegység 217 aminosavat tartalmaz /15/, így pontos molekulasúlya 24 470 D.

Izoelektromos fókuszálást vagy ioncserés kromatográfiát követően általában három aktív izoenzim formát tudtak elkülöníteni az emlősök esetében. Újabb vizsgálatok azt látszanak alátámasztani, hogy ezek az izoenzimek egy poszttranszlációs modifikáció eredményei /16/.

1. táblázat

A különböző eukaryota fajok HGPRT enzimeinek fontosabb tulajdonságai

Az enzim eredete	Nativ molekulasúly	Alegységek száma	Izoelektromos pont	Michaelis konst. purin bázisra	PRPP-re
Protozoa /Eimeria tenella/	23 000 D	1	?	3.7×10^{-7}	10^{-4}
Élesztő	51 000 D	1	5.1	2.3×10^{-5}	5×10^{-5}
Kinai hörség	100 000 D	4	6.2, 6.4, 6.6	1.1×10^{-6}	5.3×10^{-5}
Egér	100 000 D	4	?	-	-
Ember	100 000 D	4	5.6, 5.7, 5.9	2.5×10^{-5}	2.4×10^{-4}

2. Szubsztrát specificitás és kinetikai sajátosságok:

Az emlős enzimek természetes szubsztrátjai a guanin és a hipoxantin, szemben a bakteriális enzimekkel amelyeknek a xantin is szubsztrátja /4/. A mesterséges szubsztrát analógok közül a 6-tioguanint, 6-merkaptopurint és kisebb mértékben a 8-azaguanint képes az enzim felhasználni /17/. A vizsgálatok szerint a purinváz imidazol része nélkülözhetetlen az enzimhez való kötődéshez, de önmagában nem elégséges /17/.

A magnézium vagy "in vitro" körülmények között a mangán kation nélkülözhetetlen az enzim aktivitásához, mert a másik szubsztrátnak a PRPP-nek a Mg^{++} -PRPP az aktív formája. Mind az optimális alatti, mind az optimális feletti Mg^{++} ion koncentráció gátolja az enzimet /18/.

A másik szubsztrát, a PRPP esetében is képes az enzim a 6-tio ill. oxo- valamint az l-metil analógokat szubsztrátként felhasználni /17/.

Az aktív helyen lévő aminosav csoportokat vizsgálva azt találták, hogy az enzim inaktiválható SH és szabad NH_2 csoportokat modifikáló reagensekkel. Az NH_2 csoport szerepét a szubsztrát kötésben az is alátámasztja hogy az enzim irreverzibilisen inaktiválható perjodáttal oxidált PRPP-vel és GMP-vel. A szabad NH_2 csoport és a riboz-dialdehid között kialakult Schiff's bázis megakadályozza a Mg^{++} -PRPP kötődését /19,20/.

Ezen vizsgálatok alapján az aktiv helyen valószínűsített aminosavak a cisztein és a lizin /21/.

Termék gátlást mutat az enzim GMP és IMP jelenlétében. A kínai hörcsög enzim esetében 1 mM IMP hozzáadása növeli a PRPP K_m értékét és 1/3-ára csökkenti a V_{max} értékét /22/. Az inozin is gátolja az aktivitást, ugyanakkor a riboz-1-foszfátnak nincs semmi hatása.

Az első kinetikai vizsgálatok azt mutatták, hogy a PRPP kötődik először az enzimhez /17,23/. A Mg^{++} ion koncentrációtól függően azonban mind az ún. Ping-Pong mind a szekvenciális típusú reakció mechanizmus elképzelhető /17/. Néhány újabb vizsgálat egy hibrid reakciót tételez fel, ahol először a PRPP kötődik az enzimhez, majd a purin bázis szekvenciális kötődése játszódik le, amelyet a Mg-nukleozid foszfát és a Mg^{++} -PP_i komplex random felszabadulása követ /22/.

Az enzim széles pH tartományban aktív, a különböző enzimek esetében a pH optimum 8.0-10.0 közé esik.

3. A különböző fajokból származó enzimek megkülönböztetése:

A megkülönböztetés egyik lehetősége a cellulóz-acetát elektroforézis, mert a különböző fajok enzimeit némileg eltérnek töltésben és így különböző sebességgel vándorolnak /23/.

A másik lehetőség a hőinaktiváció. A HGPRT enzim rendkívül hőstabil, különösen ha PRPP-vel előinkubáljuk. Azt az időt amely alatt az enzim 80 °C-on aktivitásának felét elveszíti az enzim féléletidejének nevezzük, és ez az érték egy-egy fajra némiképpen jellemző.

Mivel a fenti értékek között a különbségek néha igen kicsik, és esetenként nem teljesen megbízhatók, a megkülönböztetés legbiztosabb módszere a specifikus ellenanyagokkal történő reakció. Erre a későbbiekben térek vissza.

4. A HGPRT gén szerkezete:

Közel egyidőben, két különböző csoport más-más megközelítéssel klónozte az egér, majd a humán HGPRT gént /24,25/. Ezek alapján a HGPRT mRNS mintegy 1600 nukleotid hosszú, amelyből 700-800 kódolja a 25 000 D-os alegységet, a többi pedig a 3' és 5' végeken elhelyezkedő nemkódoló régió. A restriktációs enzimekkel végzett hasítások azt is kiderítették, hogy maga a gén ennél sokkal nagyobb, több mint 30 kb .

A nukleinsav szekvencia analízis /26/ a rágcsálók, ill. az amírosav sorrend a humán HGPRT esetében rendkívül nagy homológiát mutatnak, /2. táblázat/ amely magyarázatot ad az emlős enzimek fizikai paramétereinek hasonlóságára.

2. táblázat

Aminosav összetételbeli különbségek a kínai hörcsög
egér és humán HGPRT enzim esetében

Aminosav pozíció	Kínai hörcsög	Egér	Humán
1	MET	MET	-
2	ALA	PRO	ALA
7	SER	SER	GLY
29	VAL	ALA	ALA
34	LYS	LYS	ARG
41	VAL	LEU	LEU
151	LYS	LYS	ARG
152	ARG	GLN	GLN
154	ASN	SER	ASN
155	LEU	PRO	PRO
169	SER	SER	PRO
175	ARG	ARG	LYS
201	ASP	ASN	ASP
205	ILE	VAL	VAL

Az adatok a kínai hörcsög és egér esetében a cDNS
szekvencia, a humán enzimmél fehérje szekvencia
meghatározásból származnak. /26, 15/

5. Genetikai jellemzők:

Az első sejtfúziós kísérletekben HGPRT enzimben mutáns sejteket használtak /27/, mert nagyon könnyű őket a vad típusu sejtektől elkülöníteni. A mutáns sejtek 6-tioguaninnal ill. 8-azaguaninnal szemben rezisztensek, és képtelenek olyan körülmények között nőni, ahol a "de novo" nukleinsav szintézist aminopterinnel gátoljuk. A vad típusu sejtek viszont képesek a folsav antagonistá jelenlétében is szaporodni, ha a tápfolyadék hipoxantint és timidint tartalmaz, mert a DNS szintézisük mellékutján a HGPRT ill. a timidin kináz enzimük segítségével biztosított a nukleotidok bioszintézise.

A HGPRT enzim hiánya ill. csökkent működése emberben a Lesch-Nyhan szindrómának nevezett, veleszületett fejlődési rendellenességet okozza /28/. A betegség fokozott húgysav termeléssel, vesekárosodással, idegrendszeri tünetekkel jár, és korai halálhoz vezet.

Enzim hiányt mutattak ki közszenyes beteg esetében is. Az enzimhiányos mutánsok genetikai vizsgálatából megállapították hogy a mutáció recesszív.

Szomatikus sejthibrideken végzett /humán-egér/ vizsgálatok az ember és az emlősök esetében az X kromoszóma hosszú karjára, a glükóz-6-foszfát dehidrogenázzal és a foszfoglicerát kinázzal egy kapcsoltsági csoportba térképezték /29/.

6. Mutáns enzimek vizsgálata:

A Lesch-Nyhan szindrómás betegek és az enzimben mutáns sejtek /spontán v. indukált/ intenzív vizsgálata megmutatta hogy a HGPRT⁻ fenotípus nem jelenti az enzim teljes hiányát. A mutáció típusától függetlenül három fő fenotípust különíthetünk el:

a, Az enzim aktivitás jelentősen csökken, a normál aktivitás 0.01-10.0 %-a.

b, Nincs mérhető enzim aktivitás, de immunológiai módszerekkel kimutatható egy ún. "keresztreagáló anyag" /CRM/, amely a normál enzim ellen termelt ellenanyaggal reagál.

c, A mutánsoknak 10-20 %-a az ahol az enzimet sem enzimológiai sem immunológiai módszerekkel sem lehet kimutatni. Mivel még a vad típusu enzim is igen alacsony szinten expresszálódik /a totál fehérje 0,01-0,05 %-a/ a mutánsok vizsgálatát csak az igen érzékeny biokémiai és immunológiai módszerek kifejlesztése tette lehetővé. Ezek közül a leghatékonyabb az enzimmel specifikusan reagáló ellenanyag előállítása volt / 30,31,32/. Ezzel a módszerrel vált lehetővé a mutáns enzimek immunaffinitás kromatográfiával történő tisztítása radioaktív izotóppal való jelölés után, és szerkezeti analízisük poliakrilamid gélen.

A nativ enzim ellen termelt ellenanyagok fajspecifikusak, és csak a nativ enzimmel reagálnak, az enzim alegységgel vagy a denaturált enzimmel nem.

Kimutatták hogy a mutációk az enzim strukturgénjét érintik, amelyek az enzim fizikai paramétereinek megváltozásában jelentkeznek, ugymint: megnövekedett ill. csökkent hőstabilitás, amely jól korrelál az enzim elektroforetikus mobilitás változásával /33/, csökkent "in vivo" stabilitás /34/, megváltozott szubsztrát specificitás és affinitás a PRPP és a hipoxantin esetében /35/. Az elektroforetikus tulajdonságok megváltozása szintén együtt jelentkezik a Michaelis konstans megváltozásával /36/.

Az antigén determinánsok megváltozását bizonyítja, hogy a részleges enzimaktivitás csökkenés a CRM teljes eltűnését eredményezte néhány beteg esetében /37/.

Ebbe a kategóriába tartozhat a mutánsok azon csoportjának egy része ahol nem mutatható ki sem enzimaktivitás sem CRM.

A mutációk típusa szerint találtak: "missense" mutánsokat amelyek hőstabilitásban, K_m -ben, aminosav összetételben különböztek a vad típustól /38/.

A "frameshift" és deléciós mutánsok többnyire CRM⁻ fenotípusúak vagy nagyon megváltozott fehérjét eredményeznek, /csökkent molekulasúly/.

Igen széleskörűen vizsgáltak és jellemeztek a korai láncterminációs mutánsok /PCT/, amelyek szintén csökkent molekulasúlyúak; és szupresszálhatók /39/.

A KISÉRLETES MUNKA CÉLKITŰZÉSE

Az elmúlt években a munkacsoportunkban előállítottak egy HGPRT⁻ kínai hörcsög sejtéből és egy csirke vörösvértestéből egy olyan hibridsejtet, amely csak egy csirke kromoszomát tartalmazott, és HGPRT⁺ volt.

Mivel mindezig nincs irodalmi adat a madaraktól származó HGPRT enzimek jellemzőiről, így az enzim részletes vizsgálata szükséges a hibridsejt további tanulmányozásához, és a HGPRT gén expressziójának vizsgálatához.

Célunk volt:

- a. Az enzim homogenitásig történő tisztítása
- b. A tisztított enzim fizikai és kinetikai paramétereinek meghatározása:
Molekulasúly, izoelektromos pont
pH függés, szubsztrát specificitás, kinetikai konstansok $/K_m, V_{max}/$
- c. Specifikus ellenanyag termeltetése az enzim ellen
/konvencionális ill. monoklonális/
- d. Ezekkel vizsgálni az enzimet sejthibridekben

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

/G-³H/-Hipoxantint és guanint /spec. akt. 1.0 Ci/mM/, valamint /8-¹⁴C/-Hipoxantint és guanint / spec. akt.: 55.5 mCi/mM/ az Amershamtól és a New England Nucleartól; a GMP-agaróz affinitás gélt, a PRPP-t, Trist, hipoxantint 2-merkaptotetanolt, glutamint, dithiotreitol, MES-t, BSA-t, a Sigma Chem. Co.-tól szereztük be.

A Sephadex G-150-et, a CNBr-aktivált Sepharose 4B-t a Pharmacia-tól, az akrilamidot, bis-akrilamidot, TEMED-et, guanint, GMP-t, IMP-t a Servatól; az Ampholine-t az LKB-től; az SDS-t a Pierce Chem. Co.-tól; az ureát a BRL-től vásároltuk.

Minden, a sejttenyésztéshez szükséges tápfolyadékot a Gibco-tól.

DE-81-es ioncserés papírt a Whatmantól; egyéb vegyszereket analitikai tisztaságban a Reanal-tól vettük.

Az enzim tisztítása:

Az enzim tisztítását Hughes et. al. /10/ módszerének módosításával és egyszerűsítésével végeztem.

A tisztítás minden lépése +4 °C-on történt, a proteolitikus enzimek gátlására Gordoxot, ritkábban PMSF-et használtam.

Egy-egy preparálásnál 50 db csirke agyból indultam ki amelyet frissen vágott csirkék fejéből vettem ki és a feldolgozásig jég között tartottam.

Az első lépésben az agyakat késes homogenizátorral homogenizáltam 3'-ig a következő pufferben :

100 mM szaharóz, 50 mM Tris/HCl pH:7.4, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT.

Utána Wheaton üveg homogenizátorral végeztem a végső homogenizálást.

30'-ig centrifugáltam 30 000 g-vel, majd a pellettet újra homogenizáltam és a centrifugálást megismételtem.

A szupernatansokat összeöntöttem, /crude extract/ és 3 h-t centrifugáltam 105 000 g-vel Sorvall A 641-es rotorban /S-100 szupernatans/.

A felüluszó pH-ját pH:5.0-re csökkentettem 1 N ecetsav cseppenkénti hozzáadásával, majd a keletkezett csapadékot kicentrifugáltam. 1 M Tris/HCl pH:9.0-el visszaállítottam a pH-t 7.4-re.

Ezután először 37 °C-ra melegítettem az enzimet, majd 85 °C-os vízfürdőn 15'-ig hőkezelttem állandó kevergetés közben; az oldat hőmérséklete 80 °C volt.

Gyorsan lehűtöttem olvadó jég között, és a keletkezett csapadékot kicentrifugáltam.

Amicon PM-10-es ultraszűrő membránon töményítettem, kb 50 ml-es térfogatra, és dializáltam többszöri puffer cserével 50 mM Tris/HCl pH:7.4, 25 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT-vel szemben.

A kidializált enzimet az előző pufferrel equilibrált GMP-agaróz affinitás oszlopra vittem fel kb. 8-10 ml/h sebességgel, majd ugyanezzel a pufferrel mostam az oszlopot fehérje mentességig.

1 mM PRPP-vel eluáltam a fennti pufferben. Töményítettem és 20 % glicerolban tároltam -20 °C-on, ahol hónapokig megőrzi aktivitását.

Az enzim aktivitás mérése:

Az aktivitás mérést Beaudet et. al./33/ módszerével végeztem. A reakció elegy térfogata 100 ul, amely tartalmaz: 50 mM Tris/HCl pH:7.4, 10 mM $MgCl_2$ 1 mg/ml BSA, 1.25 mM PRPP, 5 uM hipoxantint ill. guanint és 0,25 uCi ^{14}C v. 3H izotoppal jelzett hipoxantint és guanint.

A reakciót az enzim hozzáadásával indítottam és 37 °C-on 15'-ig inkubáltam.

A reakció leállítását 1 ml 10 mM Tris/HCl pH:7.4 , 1.5 mM EDTA hozzáadásával végeztem. A leállított reakcióelegyet jégen tartottam, majd 2.5 cm átmérőjű DE-81-es ioncserélő papíron átszűrtem amely megkötötte a keletkezett termékeket / IMP-t v. GMP-t/. A DE-81-es papírt használatig 1 M Tris/HCl pH:7.4-es oldatban equilibráltam. A filtereket háromszor mostam 10 mM Tris/HCl pH:7.4-es pufferrel, szcintillációs üvegbe tettem, majd a megkötött nukleotid monofoszfátot 3 % NaCl-el eluáltam. A radioaktivitást Bray-féle szcintillációs koktéltban mértem.

Az enzim egységeinek definíciója:

Egy enzim egység az az enzim mennyiség, amely 1 μ M hipoxantint vagy guanint alakít át 1 perc alatt 37 °C-on IMP-vé vagy GMP-vé, standard reakció körülmények között.

Elektroforetikus módszerek:

Az SDS poliakrilamid gélelektroforézist Laemmli módszerével /40/ végeztem, 10 ill. 12.5 %-os gélben, 30:1 akrilamid : bis-akrilamid arány mellett.

Az izoelektromos fókuszálást és 2-D elektroforézist O'Farrell szerint /41/, denaturáló körülmények között 9.5 M ureában, pH:5-7-es Ampholine-nal, 7500 V/h összefeszültséggel.

Ellenanyagok előállítása:

A konvencionális ellenanyag termeléshez 5 db A x DBA/2 egeret immunizáltunk az 1., 3., 7. és 30. napon, 10-10 μ g tiszta enzimmel, komplett Freund adjuvánsban.

5 nappal az utolsó immunizálás után vért vettünk az egerék szemüregéből és a szérumokat teszteltük ELISA módszerrel /42/, és kettős immunprecipitációval.

A monoklonális ellenanyag előállítása Köhler és Milstein módszerével /43/, fúziós partnerként Sp/2 kódjelű B sejt myelómát használtam.

Az immunaffinitás oszlop preparálását az ascites folyadékából $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -el precipitált, részlegesen tisztított IgG-vel végeztem, Cuetrecasas et. al. módszerével /44/.

Kettős immunprecipitáció:

A tiszta enzimet vagy sejt extraktumot meghígítottam 0,1 egység/ml-re 50 mM Tris/HCl pH:7.4, 25 mM KCl, 10 mM MgCl_2 , 1 mM DTT, 1 mg/ml BSA pufferrel, a hígított enzim 100 μ l-éhez hozzáadtam az 50 mM Tris/HCl pH:7.4, 7 mM MgCl_2 pufferben hígított antiszérumot, 12 h-t inkubáltam +4 °C-on, majd második ellenanyagként 10 μ l Eact-A-Sorb-ot /Protein A/ adtam hozzá. Szobahőn inkubáltam 30'-ig, utána lecentrifugáltam. A felüluszból mértem a maradék enzimaktivitást az előzőekben leírtak szerint.



E R E D M É N Y E K

Az enzim tisztítására kidolgozott módszer az eddiginél lényegesen egyszerűbb, és gyorsabb. A hasonló tisztaságu enzimet eddig 6-8 lépésben tisztították, amely tartalmazott:

+ultracentrifugálást

+pH-kezelést

+hőkezelést / 65, 85 °C/

+ioncserés kromatográfia / CM , DEAE -Sephadex; cellulóz/
/

+Gélkromatográfia / G-150,200/

CPG-10 /controld pore glass/

hydroxy apatit kromatográfia

+/ NH_4 / SO_4 kicsapás /40-70 %/

alkoholos kicsapás /40-66 %/

+affinitás kromatográfia : GMP-agaróz
immunaffinitás

/ a +-el jelzett módszereket próbáltam ki/

Az így tisztított enzimek általában homogének voltak, de a tisztítás hatásfoka mindössze 15-20 % volt.

Mivel a csirke enzim specifikus aktivitása alacsonyabb volt mint más fajoké /pl. hörcsög, ember/ igen lényeges a jelentős veszteséggel járó ioncserés- és gélkromatográfia kiküszöbölése.

A 3. táblázat foglalja össze a tisztítási lépéseket.

3. táblázat

A csirke HGPRТ enzim tisztítási lépései

Tisztítási lépések	Térfogat /ml/	Fehérje /mg/	Totál akt. /uM/min/	Specifikus akt. /uM/min/mg/	Hatásfok /%/	Tisztulás /-szeres/
S-100	450.0	3375.2	228.5	0.0677	100	0
pH:5.0	450.0	2475.8	217.3	0.0878	95.1	1.3
hő /80 °C/	420.0	562.8	196.9	0.349	86.1	5.2
affinitás krom.	5.73	0.148	103.0	698.1	45.7	10300.0

Agyból kiindulva, ahol a legnagyobb az enzim specifikus aktivitása /5-szörös mint a májban/, és kihasználva hogy a csirke enzim rendkívüli hőstabilitással rendelkezik, a hosszabb idejű hőinaktiválással egy olyan durva enzimpurifikátum nyerhető, amely közvetlenül felhasználható affinitás kromatográfiára.

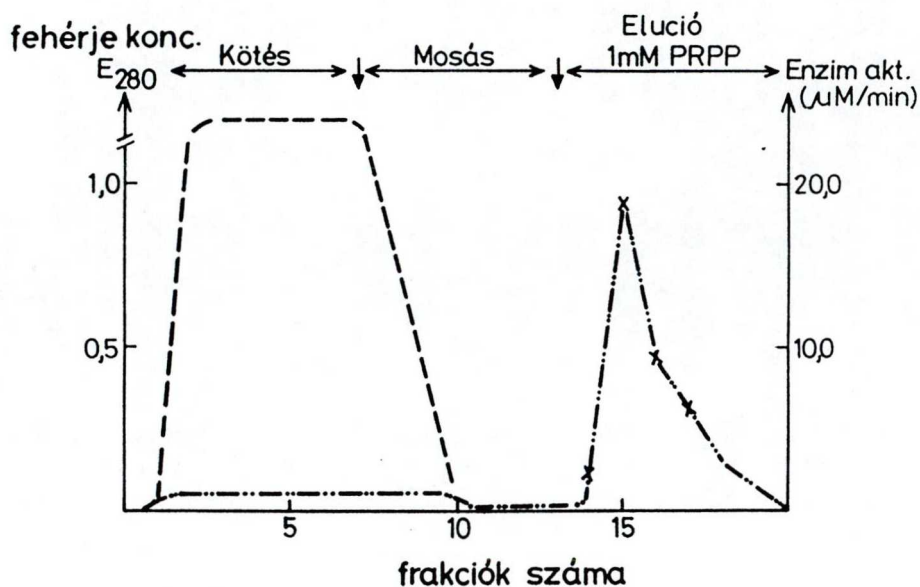
Az első három tisztítási lépés, amelyet eddig is a leggyakrabban használtak nem ad nagy tisztulást, de megszabadít a fehérjék jelentős részétől. A specifikus tisztítási lépés a GMP-agaróz affinitás kromatográfia, amely önmagában több mint 1000-szeres tisztulást eredményez. Az 1. ábra ezt a tisztítási lépést szemlélteti. Az enzimnek szinte 100 %-a kötődik az oszlophoz és a nemkötődött fehérjék lemosásánál is minimális a veszteség. Ez azt jelenti hogy a kötés igen nagy affinitású.

Az eluálás az oszlopról 1 mM PRPP-vel történik, amely egyrészt védi és stabilizálja az enzimet, másrészt specifikusabb a régebben használt 5 mM GMP-nél /45/ amely zavarja az enzim további felhasználását, mert gátolja az enzim aktivitását, és ugyanakkor nehéz tőle megszabadulni az enzim inaktiválódása nélkül.

A tiszta enzim -20°C -on 1 % BSA-val vagy 20 % glicerinnel hosszú ideig eltartható /több mint 6 hónap/ az aktivitás csökkenése nélkül.

1. ábra

A csirke HGPRT enzim tisztítása GMP-agaróz affinitás
kromatográfiás oszlopon



1 x 5 cm-es affinitás oszlopra vittem fel az 50 ml
hőkezelt enzimet, 10 ml/h átfolyási sebességgel.

5 ml-es frakciókat szedtem.

/---/ fehérje koncentráció O.D. 280 nm-nél.

/-.-./ enzim aktivitás $\mu\text{M}/\text{min}$

Ennek az egyszerű tisztításnak egyetlen hátránya hogy az affinitás kromatográfiához használt durva enzim preparátum olyan egyéb enzimaktivitást is tartalmaz, /valószínűleg valamilyen GMP-t bontó enzimet/, amely csökkenti az oszlop kapacitását, és így az csak korlátozott számú preparálásra használható /kb 5-ször/.

Az enzim tisztaságának ellenőrzése, és molekulasúlyának meghatározása:

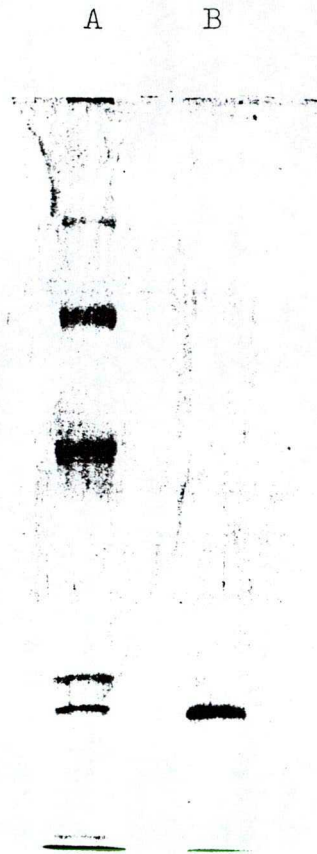
A 2. ábra a tisztított enzim SDS-poliakrilamid gél-elektroforetikus képét mutatja. Ez alapján az enzim homogénnek mondható, mert csak egy csíkot ad a gélben. Egyéb szennyező fehérjét sem a gél túlterhelésével, sem egy érzékenyebb, ezüst festési eljárással sem lehetett kimutatni.

Az enzim alegység molekulasúly a marker fehérjékkel történő összehasonlítás alapján 25 000 D, amely megegyezik az emlős enzimekével.

A nativ enzim molekulasúlyát közvetlenül nem határoztam meg, azonban a kezdeti kísérleteknél a Sephadex-G-150 oszlopon történő gélszűrésnél a kínai hörcsög enzimmal megegyező eluciós térfogatban jelent meg, tehát molekulasúlyuk megegyezik; kb 100 000 D .

2. ábra

A tisztított csirke HGPRT enzim SDS- poliakrilamid gél-
elektroforetikus képe.



A : molekulasuly marker fehérjék: Foszforiláz B. /94 000 D/,
BSA /68 000 D/, Tojás albumin /43 000/, Szénsav anhid-
ráz /29 000 D/, Kimotripszinogén A /25 000 D/.

B : 5 ug tisztított csirke HGPRT.

A marker fehérjék molekulasulya fentről lefelé csökken.

Az enzim pH függésének vizsgálata:

A csirke HGPRТ enzim széles pH tartományban aktiv, pH: 4.5-11.0 között, pH: 10.0-es optimummal.

Mint a 3. ábra mutatja, az enzimaktivitása meredeken emelkedik pH: 6.5-ig, közel állandó 6.5 és 8.0 között, és több mint 2-szeresére emelkedik 8.0 és 10.0 között, majd hirtelen csökken.

A pH hatása az enzim aktivitására részben a szubsztrátok ionos állapotát tükrözheti /46/; a PRPP pK-ja 5.9 és 6.7; a hipoxantiné 8.9 .

Izoelektromos pont meghatározása:

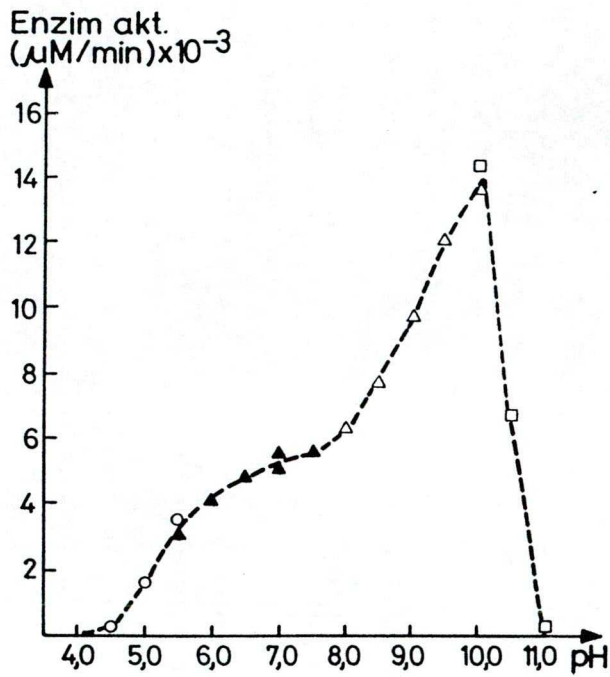
Az O'Farrell módszerével 9.5 M ureában végzett izoelektromos fókuszálás és az azt követő SDS-poliakrilamid gélelektroforézis alapján /4. ábra/ az enzimnek három izoenzim formáját tudtam elkülöníteni.

Ezek izoelektromos pontja: pH: 6.2 ; 5.9 ; 5.7 .

Ez nagyon hasonló néhány emlősből tisztított enziméhez /47/. Mivel az enzim génje egy példányban van jelen az emlős X kromoszómán, így ezek az izoenzim formák egy poszttranszlációs modifikáció eredményei /48/. Ezt bizonyították is /16/ az emberi vörösvértest enzim esetében, ahol a vörösvértest érésével összefüggő modifikációt /deamináció/ és degradációt tapasztaltak.

3. ábra

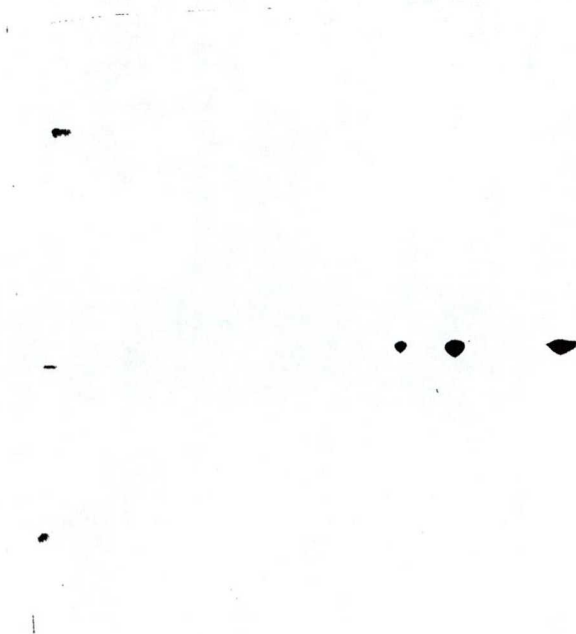
A csirke HGPRT enzim aktivitásának pH függése.



Az enzim aktivitását a módszerekben leírtak szerint mértem, azzal a különbséggel, hogy az 50 mM Tris/HCl helyett /o-o/ 50 mM acetát, /▲-▲/ 50 mM MES, /△-△/ 50 mM Tris/HCl, és /□-□/ 50 mM Caps puffert használtam.

4. ábra

A csirke HGPRT izoenzimeinek 2-D elektroforetikus képe



Az izoelektromos fókuszálást O'Farrell módszerével végeztem pH:5-7 Ampholine-nal, 9.5 M ureában.

A 2. dimenziót Laemmli¹ féle SDS poliakrilamid 12.5 %-os gélben.

A molekulasúly markerek : /fentről lefelé/

68 000 D BSA , 43 000 D tojás albumin, 24 500 D kimotripszinogén A, 12 000 D dezoxiribonukleáz I.

Az enzim hőstabilitása:

A különböző fajok esetében különbséget tapasztaltak a hővel szembeni rezisztenciánál. Ezt az enzim féléletidejével jellemzik.

A kínai hörcsög enzim esetében ez kb. 7.5 perc.

A hővel szembeni rezisztenciát a PRPP hozzáadásával jelentősen fokozhatjuk. A többi szubsztrátnak nincs ilyen hatása. A 4. táblázat a csirke HGPRT enzim hőstabilitását szemlélteti 80 °C-on.

4. táblázat

Idő	Aktivitás %	
	+ 1 mM PRPP	-
0'	100	100
10'	89.0	42.0
20'	62.2	25.0
30'	49.2	20.0
40'	40.1	13.8
50'	37.6	8.5

A csirke HGPRT enzim féléletideje 80 °C-on 30 perc,
1 mM PRPP jelenlétében.

Az enzim kinetikai jellemzői:

Az enzim Michaelis-Menten kinetikát mutat, amikor az egyik szubsztrát korlátozottan, a másik feleslegben van jelen a reakció elegyben. A reakció sebesség és szubsztrát koncentráció Lineweaver-Burk féle ábrázolását mutatja az 5. ábra a hipoxantin és guanin esetében.

A K_m érték a hipoxantinra és guaninra 1.8 μM és 5.2 μM volt, Fajsz-Endrényi módszerével meghatározva.

Az 1.8 μM -os érték a hipoxantin esetében igen jól közelít egy már leközlött 1.4 μM -os értékkel, amelyet tisztított csirke máj enzimén mértek [8]. A guanin K_m értékéről nincs összehasonlító adat. A PRPP K_m értékét nem sikerült pontosan meghatározni, jelentősen változik a Mg^{++} koncentrációval, 10-50 μM között mozog.

A 6. ábra a reakció sebesség és a szubsztrát koncentráció függésének kétszeres reciprok, Lineweaver-Burk féle ábrázolását mutatja változó guanin ill. állandó PRPP koncentrációk esetén.

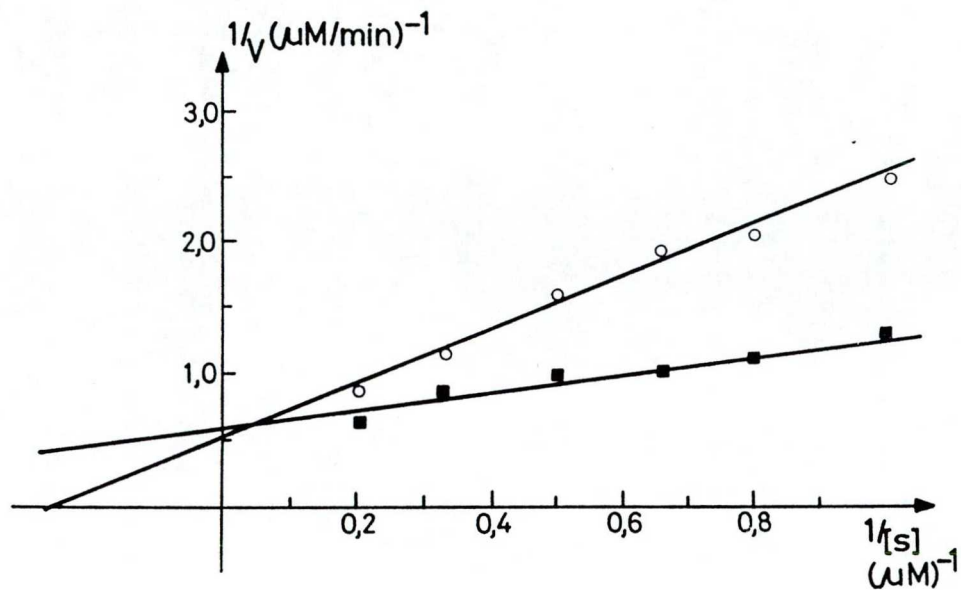
A jó közelítéssel párhuzamos lefutása az egyeneseknek Henderson és mts. szerint Ping-Pong reakció mechanizmusra utalnak. A reakció mechanizmus más irányú vizsgálatai azonban nem támasztották alá ezt a megállapítást./17/.

A reakció mechanizmus vizsgálatával én részletesen nem foglalkoztam.



5. ábra

A kezdeti reakció sebesség és a szubsztrát koncentráció
kettős reciprok ábrázolása

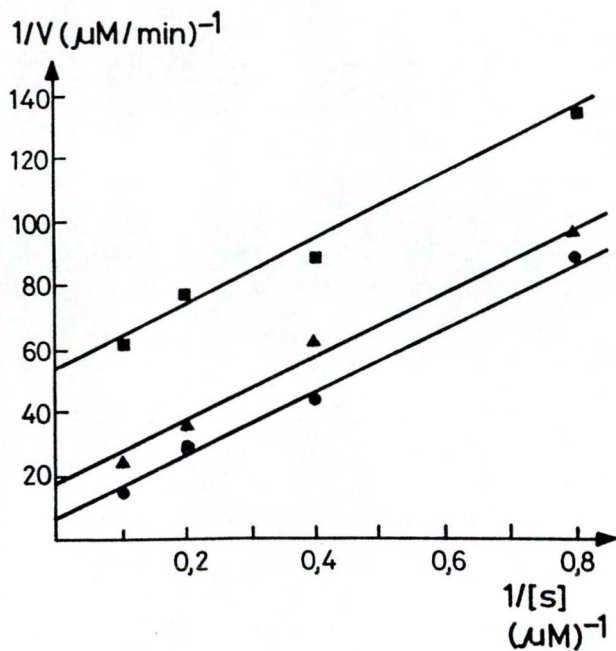


A reakció körülmények azonosak a módszerekben leírtakkal.

/■-■/ guanin ; /o-o/ hipoxantin.

6. ábra

A reakció sebesség és szubsztrát koncentráció kettős reciprok ábrázolása, különböző PRPP koncentrációknál



A reakció körülmények azonosak a módszerekben leírtakkal.

A guanin koncentráció 1.25 - 10.0 μM között változott.

A PRPP koncentráció : /■-■/ 12.5 μM

/▲-▲/ 25.0 μM

/●-●/ 50.0 μM

A konvencionális_HGPRT_ellenanyagok specifikitása:

5 db A x DBA/2 egeret immunizáltunk a módszerekben leírtak szerint a tisztított csirke agy HGPRT enzimmel. A 7. ábra mutatja a csirke és a kínai hörcsög enzim aktivitásának gátlását az egér immunszérummal. A kontrollszérum nem ad aktivitás csökkenést /nincs feltűnve/, míg az immunszérum teljes gátlást ad. Mind az 5 egérből származó ellenanyag hasonló aktivitást mutat.

Ugyancsak a 7. ábra mutatja az ellenanyag specifikitását. Az irodalomból ismert, hogy éppen az emlős enzimek nagyfoku hasonlósága miatt az ellenanyagok keresztreagálnak a különböző fajok enzimeivel /31,49/.

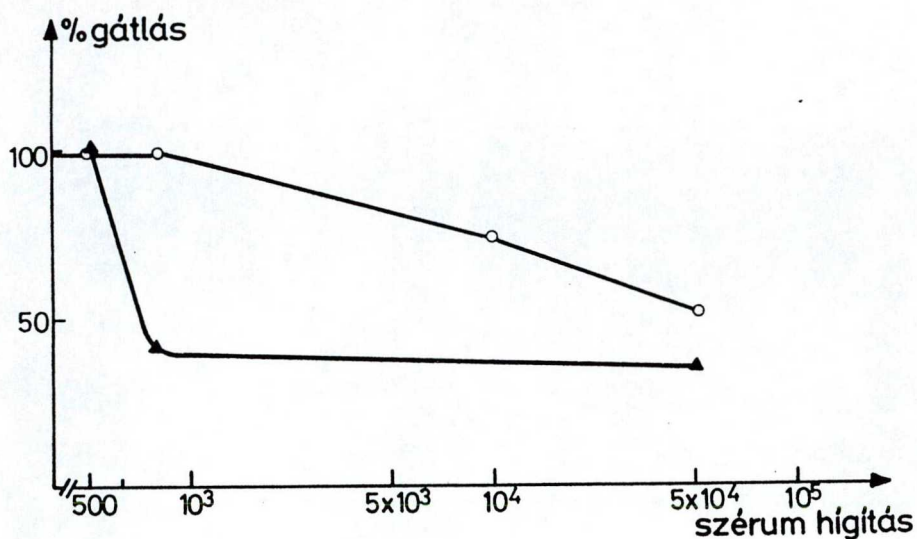
Mint látható, a csirke enzim ellen termelt ellenanyag kismértékben keresztreagál a kínai hörcsög enzimmel. Szembetűnő azonban hogy az immunszérum 1000-szeres hígítása még 100 %-os aktivitás csökkenést eredményez a csirke enzim estében, a kínai hörcsög esetében azonban csak 40 %-os gátlást kapunk.

Az antiszérumnak az ábráról leolvasható igen magas titer szintén a nagyfoku specifitásra utal.

Részlegesen tisztított egér enzimen vizsgálva nem kaptam reakciót az ellenanyaggal, ami azt jelenti hogy a csirke és az egér enzimeknek nincs közös antigéndeterminánsa.

7. ábra

Kettős immunprecipitáció csirke és kínai hörcsög AGPRT
enzimmal



0.1 miliegyység enzimet reagáltattam a megfelelően hígított ellenanyaggal a módszerekben leírtak szerint.

/ o-o / csirke enzim

/▲ - ▲/ kínai hörcsög enzim

Monoklonális ellenanyag előállítása csirke agy HGPRT ellen

A monoklonális ellenanyagok legnagyobb előnye hogy csak egy antigéndeterminánst ismernek fel, szemben a konvencionális /poliklonális/ ellenanyagokkal.

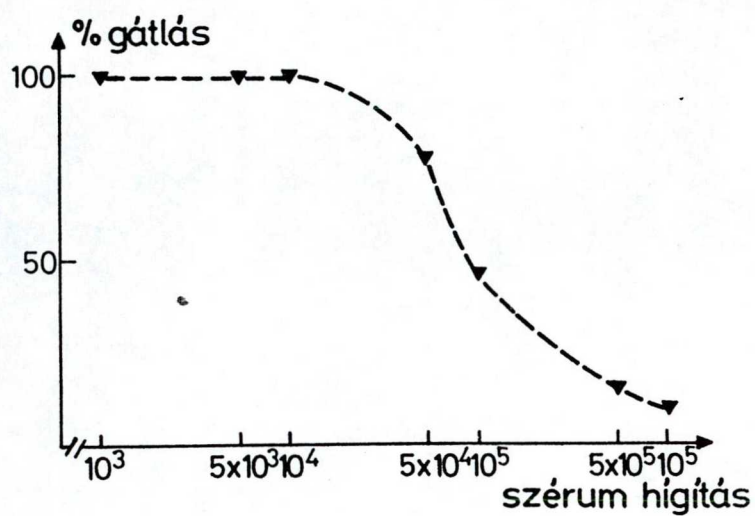
Mint az előző ábra mutatta, a csirke HGPRT ellenanyag keresztreagál a hörcsög enzimmel, ami közös antigéndeterminánst tételez fel. Ezért olyan monoklonális ellenanyag előállítását tűztem ki célul, amely csak a csirke enzimre jellemző antigéndeterminánst ismeri fel. A módszerekben leírtakkal mintegy 300 klónt vizsgáltam meg, és közülük 1-et találtam amely csak a csirke enzimre volt specifikus. A 8. ábra mutatja a monoklonális ellenanyag kettős immunprecipitációját a csirke enzimmel. Ezen látható hogy az ellenanyag nagy specifitásu, még 10 000-szeres higitásban is 100 %-osan precipitálja az enzimet. Keresztreakciót nem ad a hörcsög enzimmel, tehát kizárólag a csirke antigéndeterminánsára specifikus.

Az ellenanyag nem gátolja az enzimaktivitást, tehát az antigéndetermináns nem a szubsztrát kötő helyen vagy az aktiv centrumban van.

Mivel a monoklonális ellenanyag nagy mennyiségben előállítható, lehetővé vált egy immunaffinitás oszlop preparálása. Ennek segítségével szintén homogenitásig tisztítható az enzim, nagyobb hatásfokkal és gyorsabban. Az oszlop nem veszít kapacitásából /mint a GMP-agaróz oszlop/, így elvileg korlátlan ideig használható.

8. ábra

Csirke HGPRT enzim kettős immunprecipitációja monoklonális ellenanyaggal



0.1 miliegység enzimet reagáltattam a megfelelően hígított ellenanyaggal a módszerekben leírtak szerint.

HGPRT enzim vizsgálata monoklonális ellenanyaggal
sejthibridekben

A munkacsoportban az elmúlt években olyan sejthibrideket hoztak létre amelyek HGPRT⁻ kínai hörcsög sejt és csirke vörösvérsejt fúziójának eredményei és HGPRT⁺ fenotípusúak. A T₄C₁₅ kódjelű 20 hörcsög kromoszómát és 1 pontszerű csirke kromoszómát tartalmaz./50/.

A T₄C₁₅₁ ennek egy variánsa, amelyből "elveszett" a csirke kromoszóma /valószínűleg transzlokálódott/.

Ezek a hibridek HGPRT⁺ fenotípusúak, azonban az enzim igen alacsony szinten expresszálódik.

Csirke agyban : 0.07 uM/perc/mg fehérje

K. hörcsögben 0.30 uM/perc/mg fehérje

T₄C₁₅ sejtben 0.017 uM/perc/mg fehérje

T₄C₁₅₁ sejtben 0.014 uM/perc/mg fehérje az enzim specifikus aktivitása.

Indirekt módszerekkel eddig is valószínűsíteni lehetett hogy az expresszálódott HGPRT enzim csirke eredetű./51/, azonban az immunológiai kimutatás a legszéleskörűbben elfogadott.

A 4. táblázat az enzim aktivitás %-os gátlását mutatja kettős immunprecipitációval a csirke, a hörcsög és a két hibridsejt esetében.

Mint látható a hibridsejteken mutatott %-os gátlás szinte teljesen megegyezik a csirke HGPRT-vel adott gátlásnak.

4. táblázat

Csirke, hörcsög és hibridsejtek kettős immunprecipitációja
anti-csirke HGPRT monoklonális ellenanyaggal

Szérum higitás	Csirke agy enzim	Kinai hörcsög enzim	T ₄ C ₁₅	T ₄ C ₁₅₁
1000 x	100 %	0 %	100 %	100 %
5000 x	100 %	0 %	100 %	100 %
10 000 x	98.2 %	0 %	96.5 %	97.1%
50 000 x	78.5 %	0 %	75.2 %	76.4%

Minden esetben 0.1 egység/ml volt az enzim mennyiség
amit az ellenanyaggal reagáltattam.

A hibridsejtekből származó enzim nem volt tiszta, az S-100
frakciónak felelt meg. A mérés körülményei megegyeztek a
módszerekben leírtakkal.

A feltüntetett értékek az enzim aktivitás gátlásának %-át
jelentik.

Ö S S Z E F O G L A L Á S

A HGPRT enzim a purin nukleotid bioszintézis mentési útjának kulcs enzime. Igen részletesen vizsgálták a különböző fajok esetében, de a madarakból származó enzimről szinte semmi adat nem ismert.

A munkacsoportban folyó emlős sejtgenetikai munkák szintén szükségessé tették az enzim vizsgálatát.

Az eddigi módszereket felhasználva kidolgoztam egy módszert, amellyel az enzim 10 000-szeresen tisztítható; homogenitásig csirke agyból.

Az enzim alegység molekulasúlya 25 000 D, az enzim tetramer, nativ molekulasúlya 100 000 D, pH optimuma: 10.0 , K_m értéke hipoxantinra és guaninra 1.8 μM és 5.2 μM , három izoenzime különíthető el amelyek izoelektromos pontja: pH: 6.2, 5.9, 5.7 volt.

Ezen adatok alapján megállapítható hogy a csirke enzim rendkívül hasonló az emlős enzimekhez, egyetlen eltérés a rendkívül nagy hőstabilitás, amely összefüggésben lehet a madarak magasabb testhőmérsékletével.

Előállítottam először konvencionális, majd monoklonális ellenanyagot az enzim ellen. A konvencionális ellenanyag kismértékben keresztreakál a hörcsög enzimmel, de az egér HGPRT-vel már nem ad immunreakciót.

A monoklonális ellenanyag specifikus a csirke enzimre, nem reagál a hörcsög enzimmal, tehát csak a csirke enzim antigéndeterminánsát ismeri fel, így

alkalmas annak megbízható kimutatására. Segítségével olyan immunaffinitás oszlopot preparáltam, amely nagyobb kapacitású mint az eddig használt GMP-agaróz oszlop és specifikitása folytán gyorsabbá és egyszerűbbé teszi az enzim tisztítását.

A monoklonális ellenanyag lehetővé teszi az enzim expressziójának vizsgálatát sejt hibridekben.

A már bizonyítottan csirke enzimet tartalmazó T_4C_{15} és T_4C_{151} -es sejtekből izotópos jelölés után alacsony szintje ellenére is tisztítható, és jellemezhető az enzim immunaffinitás kromatográfiával.

Az ellenanyag segítséget nyújthat az enzim nukleinsav szinten történő expressziójának tervezett tanulmányozásához.

I R O D A L O M J E G Y Z É K

1. Seegmiller J.E.; Rosenbloom, F.M. and Kelley W.N. /1967/ Science 155. 1682-1684.
2. Lesch, M. and Nyhan W.L. /1964/ Am. J. Med. 36. 561-570.
3. Caskey C.T. and Kruh G.D. /1979/ Cell 16. 1-9.
4. Hochstadt J. /1978/ Methods Enzymology LI. 549.
5. Millner R.L.; Ramsey G.A.; Krenitsky T.A. and Elion G.B. /1972/ Biochemistry 11. 4723-
6. Schmidt R. ; Wiegand H. and Reichert U. /1979/ Eur. J. Biochem. 93. 355-
7. Nussbaum, R.L.; Caskey C.T. /1981/ Biochemistry 20. 4584-4590.
8. Wang C.C. and Simashkevich P.M. /1981/ P.N.A.S. 78. 6618-6622.
9. Olsen A.S. and Milman G. /1974/ J.B.C. 246. 4030-
10. Hughes S.H.; Wahl G.M. and Capecchi M.R. /1975/ J.B.C. 250. 120-
11. Arnold W.J. and Kelley W.N. /1971/ J.B.C. 246. 7398-
12. Muensch H. and Yoshida A. /1977/ Eur. J. Biochem. 76.
13. Holden J.A. and Kelley W.N. /1978/ J.B.C. 253. 4459-
14. Kruh G.D.; Fenwick R.G. and Caskey C.T. /1981/ J.B.C. 256. 2878-2886.
15. Wilson J.M.; Tarr G.E.; Mahoney W.C. and Kelley W.N. /1982/ J.B.C. 257. 10978-10985.
16. Johnson G.G.; Ramage A.L.; Littlefield J.W. and Kazazian Jr. /1982/ Cell 21. 960-966.
17. Kreinitsky T.A.; Papaioannou R. and Elion G. /1969/ J.B.C. 244. 1263-1270.

18. Giacomello W. and Salerno C. /1978/ J.B.C. 253. 6038-
19. Gutensohn W. and Hubert M. /1975/ Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353. 431-
20. Gutensohn W. and Jahn H. /1977/ Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 358. 939-
21. Natsumeda Y.; Yoshino M. and Tsushima K. /1977/ B.B.A. 483. 63-
22. Henderson J. F.; Brox L.W.; Kelley W.N.; Rosenbloom F.M. and Seegmiller J.E. /1968/ J.B.C. 243. 2514-
23. H. van Someren; H. Beijersberger and P. Meera Khan / 1974/ Humangenetik 22. 75-80.
24. Brennand J.; Chinault A.C.; Konecki D.S.; Melton D.W. and Caskey C.T. /1982/ P.N.A.S. 79.1950-1954.
25. Jolly D.J.; Esty A.C.; Bernard H.U. and Friedmann T. /1982/ P.N.A.S. 79. 5038-5041.
26. Konecki D.S.; Brennand J.; Fuscoe J. C.; Caskey C.T. and Chinault A.C. /1982/ Nucleic Acid Res. 10. 6763-
27. Littlefield J. /1964/ Science 154. 709-710
28. Seegmiller J.E.; Rosenbloom F.M. and Kelley W.N. /1967/ Science 155. 1682-1684.
29. Ricciuti F.C. and Ruddle F.H. /1973/ Nature New Biol. 241. 180-182.
30. Fenwick R.G.; Jr Sawyer T.H.; Kruh G.D.; Astrin K.M. and Caskey C.T. /1977/ Cell 12. 383-391.
31. Wahl G.M.; Hughes S.H. and Capecchi M.R. /1974/ J. Cell Physiol. 85. 307-391.
32. Ghangas G.S. and Milman G. /1975/ P.N.A.S. 72. 4147-

33. Balie M.E., Yip I.C., Yu F.F., Gutman A.B. Cox R. and Dancis J. /1974/ Purine metabolism in Man 195- Plenum. New York
34. Arnold W.J., Meade J.C. and Kelley W.N. /1972/ J.Clin.Invest. 51. 1805-1972.
35. Kelley W.N., Rosenbloom R.M., Henderson J.F. and Seegmiller J.E. /1967/ P.N.A.S. 57. 1735-
36. Benke P.M. and Henrick N. /1972/ Am.J. Med. 52. 547-
37. Caskey C.T., Fenwick R.G., Kruh G. and Konecki D. /1978/ EMBO Proceedings of Conference
38. Capecchi M.R., Vonder-Harr R.A., Capecchi N.E. and Sveda M.M. /1978/ Cell 12. 371-381.
39. Celis J.E. and Smith J.D. /1979/ Nonsense Mutations on tRNA Supressors Academic Press New York
40. Laemmle U.K. /1970/ Nature 227. 680-685.
41. O'Farrell P.H. /1974/ J.B.C. 250. 4007-4021.
42. Engvall E. and Perlmann P. /1972/ J. Immunol. 109. 129-
43. Köhler G. and Milstein C. /1975/ Nature 256. 495-
44. Cuatrecasas P., Wilchek M, Anfinsen C.B. /1968/ P.N.A.S. 61. 636-643.
45. Guthenson W., Huber M. and Jahn H. /1976/ Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 357. 1379-1385.
46. Dawson R.M.C., Elliott D.C., Elliott W.H. and Jones K.M. /1969/ Data for Biochemical Research 119- Clarendon Press, Oxford
47. Zannis V.I., Gudas J.L. and Martin D.W. /1980/ Biochem. Gen. 18. 1-19.

48. Ghangas G. S. and Milman G. /1977/ Science 169. 1119-
49. Beaudet A.L., Roufa P.J. and Caskey C.T. /1973/
P.N.A.S. 70. 320-324.
50. I. Raskó, S.L. Péter, L.Dallmann, and G. Bajszár
/1979/ Cytogenet. Cell Genet. 24. 129-137.
51. G. Bajszár, I. Raskó, K. Burg and S.L. Péter /1980/
Experimental Cell Research 125. 175-181.

Köszönetemet fejezem ki Dr Alföldi Lajos intézeti igazgatónak hogy lehetővé tette számomra e munka elvégzését a Genetikai Intézetben.

Köszönöm Dr Raskó István csoportvezetőmnek a téma felvetését, és a munkámhoz nyújtott útmutatásait. Köszönöm az emlős sejtgenetikai csoport minden munkatársának az értékes elméleti és gyakorlati segítségét.

Külön köszönöm Dr Andó Istvánnak és Monostori Évának a munka immunológiai részéhez nyújtott önzetlen segítségüket.