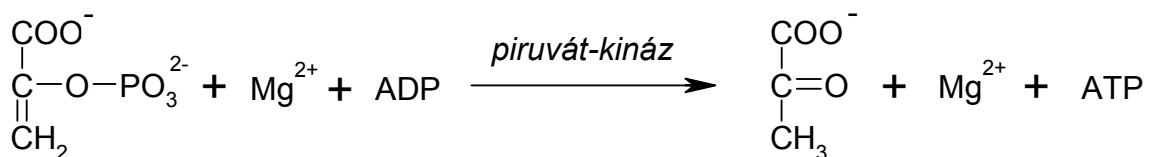


ALLOSZTÉRIKUSAN SZABÁLYOZÓ METABOLITOK HATÁSA A PIRUVÁT-KINÁZ L és M IZOENZIMRE

A glukóz piruváttá (illetve laktáttá) történő átalakulása során (glikolízis), illetve a glukóz reszintézisben (glukoneogenezis) a részfolyamatok többsége reverzibilis. E reakciók iránya és sebessége a mindenkori szubsztrátok és termékek koncentrációjától függ. A glukóz lebontás illetve szintézis nettó irányát három irreverzibilis reakció szabja meg, és csak ezen átalakulások enzimelei különböznek a glikolízisben és glukoneogenezisben. Ez nyújt lehetőséget a folyamatok sebességének igen finom - az adott szerv feladatainak, valamint az egyedi sejt igényeinek megfelelő - szabályozására. A sejtekben regulációs mechanizmusok zárják ki, hogy a glukóz szintézise és lebomlása egyidejűleg folyjék.

Az irreverzibilis lépések enzimeinek aktivitása rövid és hosszú távú szabályozó mechanizmusok ellenőrzése alatt áll. A rövidtávú szabályozás az egyes enzimek hormon-mediált, cAMP- és/vagy Ca^{2+} -függő foszforilációján, illetve defoszforilációján (prompt, külső igények megjelenítése kovalens módosítással), valamint intracellulárisan, az anyagcsere során képződő metabolitok allosztérikus hatásán alapul (pl. a sejt energiaállapotának hatására). A hosszabb távú szabályozás az egyes enzimek lebontásának, illetve szintézisének (főként az mRNS szintézis sebességének) regulálásával valósul meg. A glukóz reszintézis további elkülönítését a glikolízistől a piruvátból történő foszfoenolpiruvát képződés eltérő kompartmentalizációja (mitokondrium mátrix és citoplazma) szolgálja.

A piruvát kináz L, M és R típusú izoenzimjei szép példáját mutatják a szöveti funkció-függő allosztérikus szabályozásnak. A tetramer enzim (ATP:piruvát-foszfotranszferáz, EC 2.7.1.40.) molekulásúlya kb. 240 ezer. A katalizált reakció:



foszfoenol-piruvát
(PEP)

piruvát

E folyamat sebességét az L (máj-típusú) és R (vörösvértest-típusú) piruvát kináz izoenzimeknél az allosztérikusan kötődő ligandok a szubsztrát (PEP) iránti affinitás megváltoztatásával befolyásolják (1.ábra), míg az izom-eredetű izoenzimre ("M") nem hatnak. ATP és egyes aminosavak (pl. L-alanin) a PEP-re vonatkozó K_M -et növelik, a fruktóz-1,6-biszfoszfát pedig csökkenti. Az L és R izoenzimet ezenkívül a cAMP-függő protein kináz foszforilálhatja, és ezáltal aktivitásuk szintén csökken.

MÉRÉSI MÓDSZER

Mivel az enzimreakció során piruvát keletkezik, ez kapcsolt enzimreakcióval laktáttá alakítható (laktát-dehidrogenázzal), és ekvimoláris mennyiségű NADH oxidálódik. A NADH oxidációja 340 nm-nél fotometrával folyamatosan is mérhető. Extinkciós koefficiense, $\epsilon_{340} = 6,22 \text{ cm}^2 / \mu\text{mól}$.

Szükséges anyagok, oldatok

1. Mérési médium: 0,1 M KCl, 50mM TRIS, 10mM MgCl₂ pH 7,6. A többi törzsoldatot is ezzel készítjük és pH 7,6-ra állítjuk.
2. 10 mM NADH
3. 50 mM PEP
4. 400 U/ml laktát-dehidrogenáz (LDH): az L-izoenzim vizsgálatához piruvát kináz mentes LDH preparátum szükséges! (Ez kontroll-kísérletben ellenőrizhető.)
5. 100 mM ADP
6. 100 mM ATP
7. 50 mM L-alanin vagy 100 mM D,L-alanin
8. 2,5 mM fruktóz-1,6-biszfoszfát (FDP)
9. piruvát kináz-M (izom-típusú izoenzim): általában elég magas aktivitással tartalmazza a tisztítatlan, izom-eredetű LDH (pl. Reanal-gyártmány), ez esetben külön piruvát kinázt a reakcióhoz nem kell adni.
10. piruvát kináz-L (máj-típusú izoenzim)

A fenti enzim patkány májából preparálható. Használható a májból négyszeres térfogat "mérési médium"-mal készített posztnitokondriális felülúszó (10 000 x g, 20perc centrifugálás után a felülúszót 10 mM 2-merkaptóetanolal és 0,2 mM FDP-tal egészítjük ki és 0°C-on ammónium-szulfáttal 33-45% telítés között fracionáljuk. (33%-os telítés: minden 100 ml kivonathoz 50 ml 0 °C-on telített ammónium-szulfátot adunk, 30 percig jégben kevertetjük, majd a csapadékot centrifugálással eltávolítjuk. A felülúszó térfogatát feljegyezzük. 45%-os telítés: 7,5 g elporított ammónium-szulfátot szórunk lassan minden 100 ml felülúszóhoz, kevertetjük 30 percig (jégben hűtve), centrifugálás (J21, 16000 RPM) után a csapadékot szuszpendáljuk fel minimális térfogat 1,8 M ammónium-szulfát, 10 mM 2-merkaptóetanol, 0,2 mM FDP, 50mM TRIS-HCl, pH 7,6 oldatában). Az enzim 2-3 hétig stabil, ha ilyen körülmények között, 2-4 °C-on tároljuk. Az aktivitás méréséhez úgy kell a mérési médiummal meghígítani, hogy 20 µl-e NADH, PEP, LDH és ADP hozzáadása után kb. 0,05 Ext/perc sebességgel fogyasszon NADH-t (I. mérés). **A preparátum előre elkészítve rendelkezésre áll.**

Eszközök

1. Fotométer
2. Rekorder (fotométer analóg kivezetéséhez kötve)
3. L-alakra meghajlított keverő botocska (30 µl folyadék elférjen rajta)
4. Mikropipetta (20-200 µl között mérjen)

A kísérlet kivitelezése

1. Az ATP és FDP szabályozó hatásának vizsgálata

A törzsoldatokat és a kihígított enzimeket a mérési médium kivételével jégben tartjuk. Pipetázzuk a küvettába a reagenseket szobahőmérsékleten az alábbi sorrendben ("vak"=mérési médium):

Médium: 0,82 ml

PEP: 20 μ l

NADH: 20 μ l

Keverjük meg a küvetta tartalmát. Állítsuk a rekorder kijelzőjét kb. 90% állásba. Indítsuk el a rekordert 1 cm/perc sebességgel. Az anyagok hozzáadása során nem kell a rekordert leállítani.

További hozzáadások:

LDH: 20 μ l

PK-L: 20 μ l (a kanálka fel-lefelé mozgásával elkeverjük).

Felvesszük kb. 2 percig az alapvonalat. A továbbiakban a reagenseket a kanálka tövéhez pipetázzuk és amikor szükséges, a fotométer fedelét felemelve gyors mozdulattal a küvettába juttatjuk; 2-3-szor fel-le mozgatva a kanálkát a küvetta tartalmát megkeverjük, a kanálkát kiemeljük és a küvettateret lecsukjuk.

Start:

(1): ADP: 20 μ l Gyorsan elkeverjük. 2 percig mérjük a változást.

(2): ATP: 20 μ l Gyors keverés, további 2 percig mérés.

(3): FDP: 20 μ l Gyors keverés, mérés, amíg el nem fogy a NADH. Írjuk fel a műszerek beállítására (méréshatárára) vonatkozó adatokat.

2. Az L-alanin és FDP szabályozó hatása

A mérést az előzőekben leírt módon kezdjük, és a start (1) utánig (ADP-adás) minden ugyanaz. A (2) lépésben azonban ATP helyett 20 μ l alanint adunk. 3 perc után további 80 μ l alanint adunk, és a reakciósebességet 3 percig mérjük. Végezetül 20 μ l FDP-vel aktiválhatjuk az enzimet. Ismételjük meg a fenti reakciókat PK-M jelenlétében (PK-L helyett). A rekorderen kapott görbéket csatoljuk a jegyzőkönyvhöz.

Az eredmények értékelése

Az enzimreakció sebessége, v (μmol képződött ATP/perc/ml enzimoldat = μmol NADH oxidáció/perc/ml enzim) a percenkénti extinkcióváltozásból:

$$v = \frac{V * \frac{\Delta E}{\text{perc}}}{6,22 * 0,22}$$

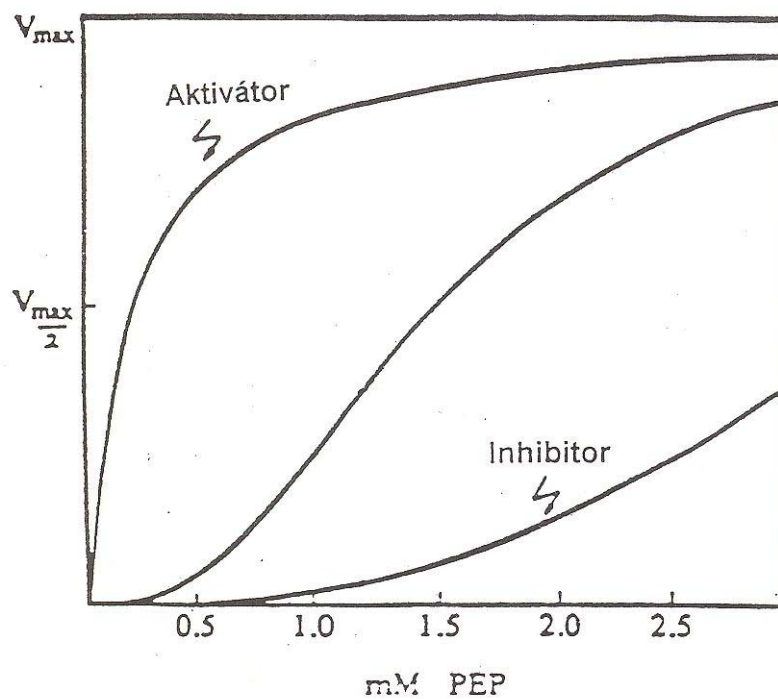
ahol V a reakcióelegy térfogata (ml) az adott $\Delta\text{Ext}/\text{perc}$ sebességet előidéző reagens hozzáadása után.

A sebességek összehasonlítására az ADP-hozzáadás utáni értéket vehetjük 1,0-nek, és az allosztérikus effektorok jelenlétében mért sebességeket ehhez viszonyíthatjuk : "f", lásd Táblázat.

Reakció sebesség						
	PK-L			PK-M		
Reagens	$\Delta\text{Ext}/\text{perc}$	$\mu\text{mol}/\text{p}/\text{ml}$	f	$\Delta\text{Ext}/\text{perc}$	$\mu\text{mol}/\text{p}/\text{ml}$	f
ADP			1,0			1,0
ATP						
FDP						
Ala						

Következtetések és problémák

1. Keresse meg az 1. ábrán azt a foszfoenol-piruvát koncentrációt, melyet Ön a kísérlet során használt, és hasonlítsa össze eredményeit az ábrán látottakkal. Alátámasztják-e eredményei a piruvát-kináz izoenzimnek a bevezetésben ismertetett allosztérikus sajátosságait? Kapott-e különbséget az L és M izoenzim viselkedésében ATP, alanin és FDP jelenlétében? A kísérlet esetleges sikertelensége esetén hol követhetett el hibát?
2. Gondolja végig, milyen tényezők szabályozhatják a máj piruvát-kináz aktivitását, szénhidrátgazdag-táplálkozást követően. Milyen fiziológiai következményekkel jár az ilyen táplálkozás? Milyen fiziológiai jelentősége lehet a májban a piruvát kináz aminosavak által okozott gátlásának?
3. Az FDP stabilizálja a máj-izoenzimet. Milyen okra tudja ezt a jelenséget visszavezetni?



1. ábra: Piruvát kináz L izoenzim aktivitásának szubsztrát-koncentráció függése telítési ADP-koncentrációnál.

Középső görbe: effektor nélkül, felső görbe: aktivátor, alsó görbe: inhibitor jelenlétében.