

Ubiquitin Aktivite Edici Enzimin (E1) Eldesi ve Kinetik Özellikleri

OBTAINING OF UBIQUITIN ACTIVATING ENZYME AND KINETIC FEATURES

Ahmet KIZILTUNÇ*, İbrahim PİRİM**, Yaşar Nuri ŞAHİN***

* Uzm.Dr.Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ABD,

** Yrd.Doç.Dr.Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ABD,

** Prof.Dr.Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ABD, ERZURUM

ÖZET

Hücrede sentezlenmiş olan anormal proteinlerin ortadan kaldırılmasını bilinen iki mekanizma ile gerçekleştirebilir. Bu mekanizmaların birincisi ekstraselüler membranda bulunan uzun ömürlü anormal proteinlerin lizozomlarda ATP'ye bağımlı olmayan yollarla yıkılmasıdır. Kısa ömürlü anormal protein yıkımında görev alan ikinci mekanizma olan ubiquitin (Ub) sistemi, ATP'ye bağımlı olarak aktive edilir. Ub aktivasyonundan sorumlu enzim (E1) kovalent afinite kolon kromatografisi ile plasentadan saflaştırıldı. Bu enzimin saflığı sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ile tesbit edildi ve kinetik özellikleri incelendi. İnhibitör olarak kullanılan etilmaleimid (C₆H₇NO₂), etilendiamintetraasetat (EDTA) ve civanitrat (Hg(NO₃)₂) gibi maddelerin enzimi inhibe ettiği gözlemlendi. Enzimin optimum pH'sı 7 ve optimum sıcaklığı 35°C olarak belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Ubiquitin, Ubiquitin aktive edici enzim

T Klin Tıp Bilimleri 1995, 15: 260-264

Bütün ökaryotik hücrelerde bulunan ubiquitin proteinini intraselüler proteinlere kovalent bağlı olarak veya serbest formda bulunur (1). Ubiquitin ısıya dayanıklı, 76 amino asitli (MA 8500), bütün türlerde iyice korunmuş, globuler evrensel bir proteindir (2). Lizozomal harici protein yıkımında anormal kısa ömürlü yıkılacak proteinleri etiketleyerek yıkılmalarına sebep olur. Yıkılacak proteinler ile Ub'nin konjugasyonu intraselüler proteinlerin enerjiye bağımlı olarak parçalanmasında önemli bir rol oynar (3). ATP gerektiren Ub-protein konjugasyon

Geliş Tarihi: 21.11.1994

Yazışma Adresi: Ahmet KIZILTUNÇ
Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi
Biyokimya ABD,
ERZURUM

SUMMARY

Abnormal proteins synthesized within cells are degraded by known two mechanisms. One is the degradation of long-lived proteins found or extracellular membranes by ATP dependent lysosomal system second mechanism, known ubiquitin system functions to degrade abnormal short-lived proteins. The enzyme that is responsible for ubiquitin activation were purified from placenta using affinity chromatography. The enzyme that is responsible for ubiquitin activation were purified from placenta using affinity chromatography. The enzyme purity were checked by SDS-PAGE and kinetic features were examined. It has been found that ethilmaleimid (C₆H₇NO₂), EDTA and Hg(NC>3)₂ were inhibitor of the enzyme optimum pH of the enzyme was 7 and optimum temperature was 35°C.

Key Words: Ubiquitin, Ubiquitin activating enzyme

T Klin J Med Sci 1995, 15: 260-264

reaksiyonunda, Ub'nin COOH terminalinin (Giy 76) yıkılacak hedef protein substratının e-NH₂ Lizin grubuna bağlanmış olmalıdır. Ub-protein konjugatı çabucak parçalanarak Ub yeniden kullanılmak üzere serbestleşir (4). Karakteristik sülfidril (-SH) gruplarına sahip E1 (ubiquitin aktive edici) enzimi (105.000 dalton) Ub'nin COOH grubuna tioester bağı ile bağlanarak aktif duruma geçirir. Aktiflenen ubiquitin daha sonra Ub taşıyıcı enzim (E2) üzerinden, Ub protein ligaz enzimine (E3) aktarılarak fonksiyonu tamamlanmış olur (5).

Protein parçalanması ve konjugasyonundaki kritik fonksiyonu itibarı ile ubiquitin aktive edici enzimin rolü hakkında daha detaylı bilgi elde etmek için E1 enzimi afinite kromatografisi ile saflaştırıldı ve bazı inhibitörlere olan duyarlılığı ile belirsizlik içinde olan optimum pH ve optimum sıcaklık değerleri incelendi.

MATERYEL VE METOD

Ubiquitini aktifleyici enzim Scheider, Cuatrecases ve Kohn'un kullandığı metodlardan kısmen faydalanarak Ciechanover ve arkadaşlarının eritrosit ve retikülositlerden enzimi saflaştırma için kullandıkları metodla plasentadan saflaştırıldı (6-10). Plasentanın membranı uzaklaştırıldıktan sonra yaklaşık 700 gr plasenta 150 mM KCl+200 ul merkaptotanol çözeltisi ile üç defa yıkandı. Önceden soğutulmuş cycle-blend homojeneatöründe 20 mM Tris-HCl+1 mM EDTA ve %2'lik gliserol çözeltisinden 30 v/5v/10v oranlarında ilave edildi ve numuneler 175 gr'lık dört grup halinde homojenize edildi. Homojenat 10.000 rpm'de santrifüj edildi ve supernatant toplandı. Toplanan 200 ml supernatant 150 ml 0.2 mM 2,4-dinitrofenol ve 150 ml 20 mM 2-deoksiglikoz çözeltileri ile inkübe (37°C, 2 saat) edildi. Müteakip işlemde 1 mM ditioeritrol (DTT) ihtiva eden 2 litre saf su ile muamele edildi ve 80.000xg'de 90 dakika santrifüj edilerek supernatant toplandı (fraksiyon I). 60 ml supernatant 3 mM potasyum fosfat (pH 7) ile dengelenmiş 3x74 cm'lik DEAE-selüloz (Whatman, DE-52) kolonuna uygulandı. Bağlanmamış moleküller 1 mM DTT ihtiva eden 3 mM potasyum fosfat tampon çözeltisinin 150 ml ile elüe edildi. Kolon dolgu maddesine bağlanmış olan moleküller 0.5 mM KCl, 1 mM DTT ve 10 mM Tris-HCl (pH 7.2) ihtiva eden solüsyonun 150 ml ile elüe edildi. Elüatlara amonyum sülfatla çöktürme ve diyaliz işlemleri uygulandıktan sonra elde edilen çözelti toplandı (fraksiyon II). Sefaroz 4B bileşiğinin 10 gr'ı 30 ml saf suda şişirildi ve suyu atıldı. Ligand görevi görecek olan ubiquitinden (sigma 6235) 400 ul, uzantı kolu olarak 6-C'lu N-hidroksisüksinamitden (sigma 7377) 1 mg, 200 ml glasiyelasetik asit, 800 ml Tris-HCl (pH 7.2) ihtiva eden solüsyon ve şişirilmiş sefaroz 4B materyali gece boyunca -4°C'de düşük hızda manyetik bar yardımı ile karıştırıldı. Elde edilen bu homojen çözelti mini kolonda (2x15, Pharmacia) paketlenildi. 1 M NaCl ihtiva eden 0.1 M Na-asetat (pH 4) ve 0.1 M Tris-HCl (pH 8) çözeltileri ile sırası ile üç defa yıkandı. 0.2 mM DTT, 5 mM **MgCl₂**, 2 mM ATP ihtiva eden 50 mM Tris-HCl (pH 7.2) tampon çözeltisi ile kolon dengelendi. Fraksiyon II çözeltisinden 30 ml behere alınarak üzerine 50 mM Tris-HCl, 5 mM ATP (sigma), 10 mM **MgCl₂**, 0.2 mM DTT ve 5 ünite/ml inorganik pirofosfataz (sigma) konuldu ve homojen bir çözelti elde edildi. Bu çözeltinin tamamı afinite kolonuna uygulandı ve kolon yukarıdaki tampon çözelti ile yıkandı. 1 M KCl ihtiva eden 50 mM Tris-HCl (pH 7.2) çözeltisi ile üç defa kolon yıkandı. 0.04 mM NaPPI ve 2 mM AMP (sigma) ihtiva eden 50 mM Tris-HCl (pH 7.2) çözeltisi ile bağlı molekül elue edildi. Fraksiyon II çözeltisi 25-30 mg/ml ve kolondan alınan eluat (E1 proteini) 3-5 mg/ml protein ihtiva etmekteydi (Protein konsantrasyonu Lowry (11) metodu ile, sığır serum albümin standardı kullanılarak hesaplandı). Enzimin saflığı SDS-PAGE ile test edildi (12).

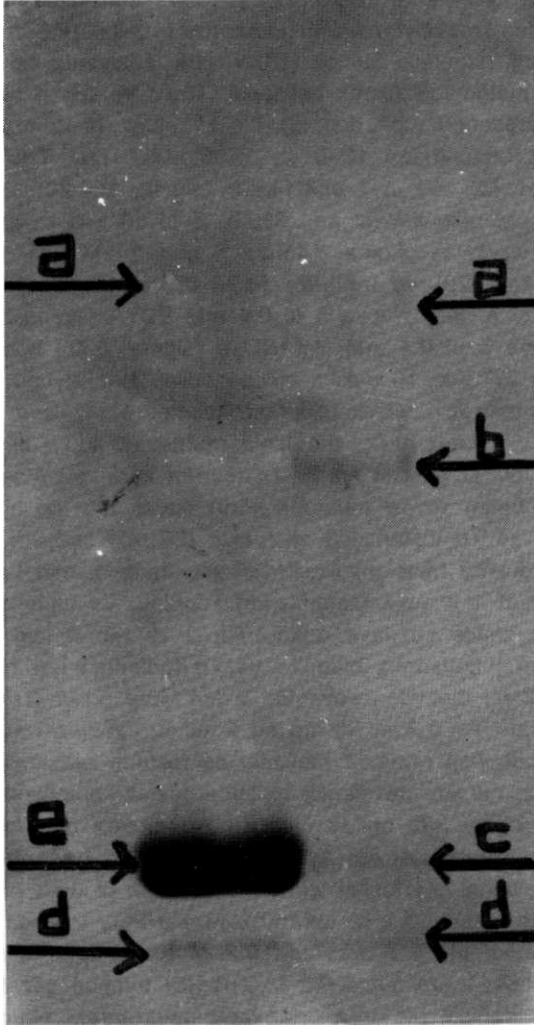
Saf olarak elde edilen E1 enziminin kinetik özellikleri, reaksiyon ürünü inorganik fosfatın (Pi) absorbanı değerinin Munoz (13) ve ark. kullanmış oldukları metodla ölçülerek belirlendi. Tüp I ve tüp II olarak işaretlenen tüplerden tüp I'le kolondan aldığımız saf E1 enziminden 1300 ul, 1500 ul 50 mM Tris-HCl (pH 7.2), 50 ul 1 mM MgCl₂ (sigma, 104-20), 20 ul 2 uM ubiquitin (sigma, 6235), 5 ul 50 mU inorganik pirofosfataz (sigma, 14503), 5 ul 0.2 uM ATP (sigma, 1020) ve inhibitör [4 ul 0.5 mM etilmaleimid (sigma, 3876) veya 5 ul 0.4 mM EDTA (sigma, 285) veya 5 ul 0.4 mM Hg (**NÜ3**)₂ (sigma, 830)] konuldu ve 37°C'de 10 dakika inkübe edildi. Reaksiyonu durdurmak için %5'lik triklorasetikasitten 1 ml ilave edildi, inhibitör hariç, tüp II'nin muhtevası tüp I ile aynıydı. Tr (reaktif körü), Ts (serum körü, sığır serum albümin) ve Tn (numune körü) olarak altı tüp alındı. Tr ve Tn tüplerine 3 ml reaktif (20 mM sodyum molibdat+82 mmol nitrikasit+100 mg trietanolamin Lauril-sülfat 1 lt suya tamamlandı) konuldu. Ts tüplerine 3 ml distile su ilave edildi. Tüp I ve tüp II için ayrı ayrı hazırlanmış olan Ts ve Tn tüplerinin her birine 0.2 ml tüp I'den veya tüp M'den ilave edildi. Tr tüplerine de 0.2 ml distile su konuldu. Tüpler vorteksleildi. Asit ortamda molibdat ile fosfatın reaksiyonundan oluşan sarı renkli molibdat-fosfat kompleksi absorbanı 390 nm'de ölçüldü. Bilinmeyen numunenin absorbanı A=A_n-(A_s-A_r) formülünden hesaplandı. Optimum pH tesbiti için Pi absorbanı ölçümü pH=3-5 arasında 0.1 M sitrat/0.2 M **K₂HPO₄** tampon çözeltisi, pH=5-7 arasında 0.2 M fosfat tamponu ve pH=7-11 aralığında 0.2 M Tris-HCl tampon çözeltileri ile değişik pH'larda ortamlar oluşturularak, optimum sıcaklık tesbiti için aynı pH aralıklarında pH sabit tutularak değişik sıcaklıklarda reaksiyonlar yapıldı ve Pi absorbanı değerleri ölçüldü.

SONUÇLAR

Ubiquitin sefaroz afinite kolonu ile saflaştırılan proteinin (E1 enzimi) saflığı SDS-PAGE ile test edildi. Saflaştırılmış E1 enziminden ve standartlardan (sigma M-5505) 30 ml polyakrilamit jeline (%5 yığıma jeli ve %14.5 yürütme jeli) uygulandı. Elektroforezi müteakip jel coomassie blue boyası ile boyandı. Standart proteinlerle karşılaştırılarak enzim proteinin saf olduğuna karar verildi (Şekil 1). Etilmaleimid, EDTA ve civa tuzlarının enzim proteini üzerine olan etkileri materyal ve metotta anlatılan yolla belirlendi (Şekil 2,3,4). Enzimin optimum aktif olduğu pH ve sıcaklık Şekil 5 ve 6'da gösterildi.

TARTIŞMA

Kısa ömürlü anormal intraselüler proteinlerin enerjiye bağımlı parçalanmasında önemli bir rol oynayan Ub

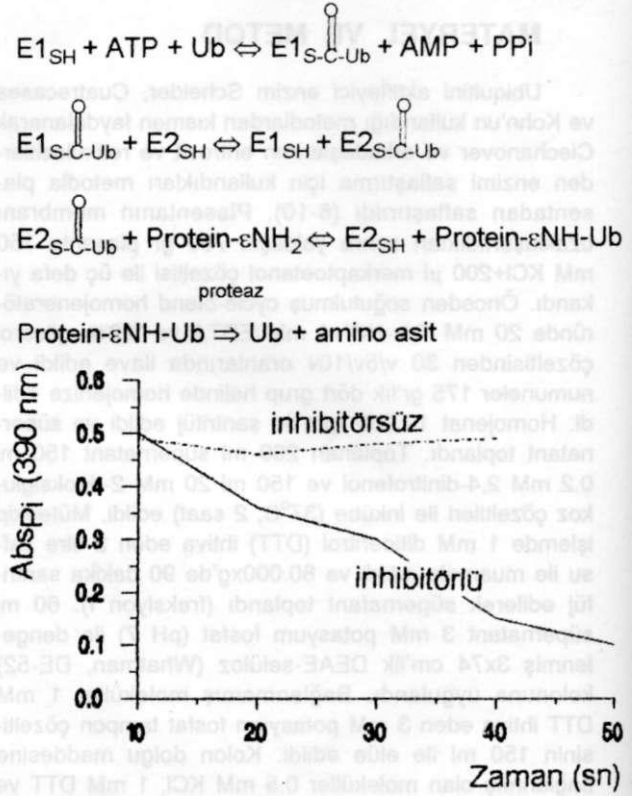


Şekil 1. Saflaştırılan enzim proteininin (E1) SDS-PAGE ile test edilmesi.

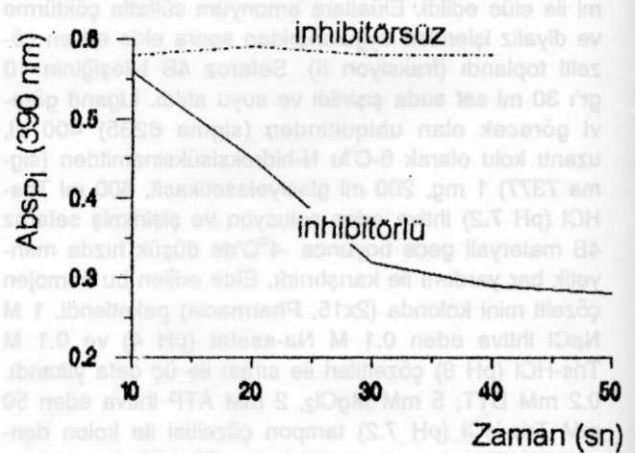
- a*. Katalaz, MA: 230.000
 b*. Myozin, MA: 200.000
 c*. b-Galaktozidaz, MA: 116.000
 d*. Fosforilaz b, MA: 92.500
 e. Saf E1 enzim protein bandı
 *. Standart proteinler (Sigma)

polipeptidinin proteinlerle konjugasyonu kritik bir öneme sahiptir. Ub-protein konjugasyonu üç adımlı bir multienzim kompleksi tarafından başlar (14).

Aktive edici enzim (E1) konjugasyon işleminde aktifleyici özelliğe sahiptir. Enzimin **-SH** fonksiyonel grupları ile Ub proteini arasında oluşan tiol ester bağı yüksek enerjili bir bağıdır. Aktif **-SH** grupları inhibe edildiği zaman enzim inaktif duruma geçer (15). Enerji zengin aktive olmuş polipeptidin ve enzim arasındaki enerji zengin tiol ester bağı aside karşı dayanıklı iken dilüe baz, hidroksilamin, borohidrit ve civa tuzlarına karşı dayanıksızdır (15). Enerji zengin tiol ester bağı **acil**

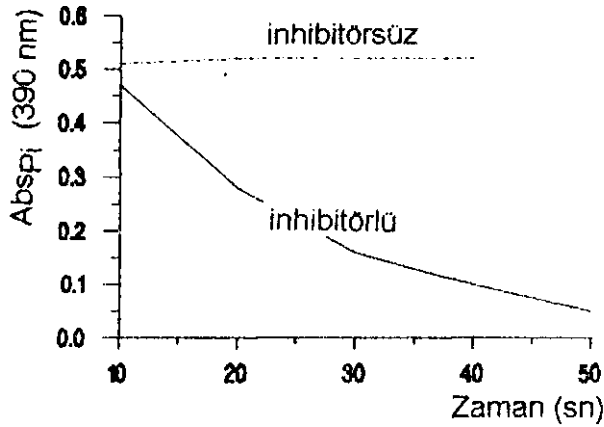


Şekil 2. Hg²⁺ iyonunun inhibisyon etkisi



Şekil 3. Etilmaleimid inhibisyonu

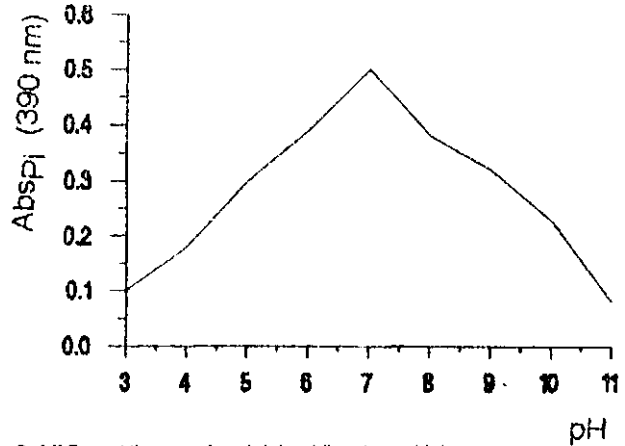
grubunun aktive olmuş durumunda korunur ve böylece bağlanacak peptid bağına oluşumunda bir reaktif ara madde olarak hizmet edebilir. Enzim aktivitesi için Mg²⁺ iyonu ve ATP gereklidir. GTP ve CTP nükleozidleri ATP kadar etkin değildir (9,15). Aktive olmuş polipeptid ve **-SH** fonksiyonel gruplarına sahip enzim arasındaki tiol ester bağına parçalayıcı özelliği ile enzim aktivitesi civa iyonları tarafından inhibe edilir (15). Çalışmamız da afinite kolonundan saflaştırılan E1 enzimi civa iyonları tarafından inhibe edildiği gözlemlendi (Şekil 2). Ub-protein konjugasyonu hedef proteinin büyüklüğü ile alkalı olduğu gibi, aktive edici enzimin inhibisyonu ile



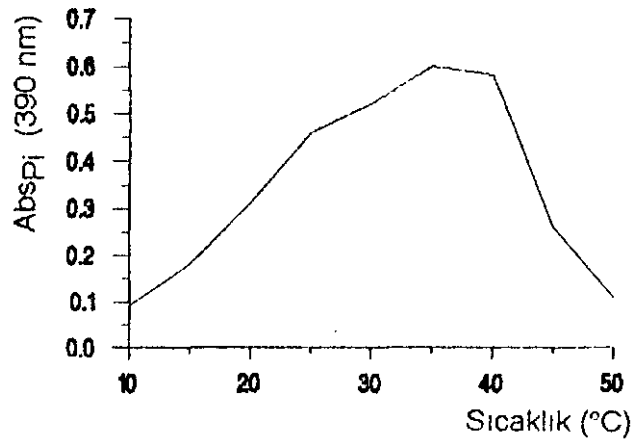
Şekil 4. EDTA inhibisyon etkisi

de ilgilidir. Etilmaleimid inhibitörü tarafından enzimin sülfhidril grupları bloke edildiği için enzimin inaktif duruma geçtiği çalışmamızda gözlemlendi (Şekil 3). EDTA'nın ilavesi ile E1-Ubiquitin oluşumu engellendi (Şekil 4). EDTA ortamda aktivatör olarak mevcut olan Mg^{2+} iyonunu inaktif duruma geçirir ve dolayısıyla substrat olan E1 ve Ub'in ATP'nin etkisizliği ile bağlanamaz ve reaksiyon inhibe olmuş olur. Makale taramalarında E1 enzimi daha önceden plasentadan saflaştırılmadığı gibi başka kaynaklardan saflaştırılmış E1 enziminin de yukarıdaki inhibitörlerle olan ilişkisine rastlanmadığından çalışmamız kendi bulgularımızla mukayese edildi. PH enzim üzerindeki ionize olabilen grupların yüklerini ve substratın yükünü değiştirerek enzim aktivitesini etkiler (16). Söz konusu enzim de pH ya aktif yapıyı değiştirerek veya substrat bağlamada görev alan rezidü üzerindeki -SH gruplarını inaktive ederek aktiviteyi etkilediği müşahade edildi. Hatfield ve ark. (17) enzimin optimum pH değerini 8 olarak tesbit etmelerine rağmen bizim çalışmamızda E1 enziminin optimum pH değeri 7 olarak belirlendi (Şekil 5). Böylece enzimin maksimum aktivitesinin nötr pH'da daha aktif olduğu kanısına varıldı. Enzim proteinleri düşük sıcaklıklarda yeteri kadar aktif değildirler. Artan sıcaklıkla beraber reaksiyona giren moleküllerin kinetik enerjilerinin artması sebebi ile söz konusu reaksiyonun hızı artar (18). Bununla beraber enzimin aktivitesinden sorumlu hidrojen ve hidrofo-bik bağlarda artan sıcaklıkla parçalanarak sekonder ve tersiyer yapının kaybı ile birlikte enzim proteini denature olarak inaktif duruma geçer. Bu sebeple bütün enzimlerin maksimum aktivite gösterdikleri bir sıcaklıkları vardır (18,19). Hatfield ve ark. (17) enzimin aktif olduğu sıcaklığı 30°C olarak belirlemelerine rağmen, bizim çalışmamızda söz konusu enzimin aktif olduğu sıcaklık 35°C olarak tesbit edildi (Şekil 6).

Bundan sonraki çalışmalarımız ubiquitin aktive edici enzimin diğer özelliklerini kinetik ve doku seviyesinde araştırmak ve multi enzim sisteminde görev alan diğer enzimler hakkında araştırmalar yapmaya yönelik olacaktır.



Şekil 5. pH'nın enzim aktivitesi üzerine etkisi



Şekil 6. Sıcaklığın enzim aktivitesine olan etkisi

KAYNAKLAR

1. Bachmaier A, Finley D, and Varshavsky A. In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science* 1986;234:179-86.
2. Haas AL, Warms JVB, Hershko A, and Rose IA. Ubiquitin-activating enzyme. *J Biol Chem* 1982; 257:2543-8.
3. Ciechanover A, Elias S, Heller H, Ferber S, and Hershko A. Characterization of the heat-stable polypeptide of the ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes. *J Biol Chem* 1980; 255:7525-8.
4. Schwartz AL, Trausch JS, Ciechanover A, Slot JW, and Gueze H. Immunoelectron microscopic localization of the ubiquitin-activating enzyme E1 in HepG2 cells. *Proc Natl Acad Sci* 1992; 89:5542-6.
5. Pickart CM and Rosell IA. Functional heterogeneity of ubiquitin carrier proteins. *J Biol Chem* 1985; 260:1573-81.
6. Scheider R, Eckerskorn C, Lottspeich F, and Schweigler M. The human ubiquitin carrier protein E2 (17kDa) is homologous to the yeast DNA repair gene. *RAD6 EMBO J* 1990;9(5):1431-5.
7. Cuatrecasas P, Wilchek M, Anfinsen CB. Selective enzyme purification by affinity chromatography. *Proc Nat Acad Sci* 1968;61:636-43.

8. Kohn J, Wilchek M. A colorimetric method for monitoring activation of sepharose by cyanogen bromide. *Biochem Biophys Res Commun* 1978;7-14.
9. Ciechanover A, Elias S, Heller H, and Hershko A. Covalent affinity purification of ubiquitin-activating enzyme. *J Biol Chem* 1982; 257:2537-42.
10. Ciechanover A, Hod Y, Hershko A. A heat-stable polypeptide of an ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1978; 81 (4):1100-5.
11. Lowry OH, Rosebrough NJ et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265.
12. Laemmli DK. Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of bacetriophage T4, *Nature London*, 1970; 227:680.
13. Munoz MA, Baton M, and Fernandez C. Direct determination of inorganic phosphorus in serum with a single reagent. *Clin Chem* 1983; 29(2):372-4.
14. Cook J, and Chock PB. Ubiquitin; A review on a ubiquitous biofactor in eukaryotic cells. *Biofactors* 1988; 1:133-46.
15. Ciechanover A, Heller H et al. Activation of the heat-stable polypeptide of the ATP-dependent proteolytic system. *Proc Natl Acad Sci* 1981; 78:761-5.
16. Lipscomb WN. Structure and catalysis of enzymes. *Annu Rev Biochem* 1983; 1983; 52:17.
17. Hatfield PM, and Vierstra RD. Ubiquitin-dependent proteolytic pathway in wheat germ; Isolation of multiple forms of ubiquitin-activating enzyme, E1. *Biochemistry* 1989; 28:735-42.
18. Mildvan AS. Mechanisms of enzyme action. *Annu Rev Biochem* 1974; 43:357.
19. Sigman DS, and Mooser G. Chemical studies of enzyme active sites. *Annu Rev Biochem* 1975; 44:889.