

Э. С. ГЕВОРКЯН, Г. А. ПАНОСЯН

О МОЛЕКУЛЯРНЫХ ВЕСАХ ИЗОЗИМОВ ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ СЕРДЦА КРЫС

Определены молекулярные веса трех изозимов холинэстеразы сердца крыс. Показано, что значения их разные, причем разница составляет примерно 150000 единиц. Экспериментами по выявлению изозимов холинэстеразы в присутствии Na-додецилсульфата и мочевины показано, что, по-видимому, они являются полимерами одного и того же мономера. Предполагается, что данные изоферменты сердца крыс (ХЭ-1, ХЭ-2, ХЭ-3) являются димером, тетрамером и секстамером.

Исследование изозимного состава и определение молекулярного веса индуцируемых ферментов имеет важное значение как с точки зрения изучения их физико-химических свойств и субъединичной структуры, так и для выявления генетической основы биосинтеза того или иного изозима.

В наших предыдущих работах [2—4] была обнаружена гормональная индукция холинэстеразы у млекопитающих и был выявлен изозимный состав фермента в контроле и при индукции. Исследования позволили высказать предположение, что истинной причиной гормональной индукции холинэстеразы сердца крыс является усиление активности действующих генов (или гена) холинэстеразы, а не дерепрессия неактивных генов, так как изозимный состав индуцированного фермента количественно не отличался от состава изоферментов в контроле. Три изозима холинэстеразы сердца крыс, выявленные нами методом диск-электрофореза в полиакриламидном геле, обладали различной активностью, причем наибольшую активность имела фракция с меньшей электрофоретической подвижностью [2]. Определение их молекулярных весов и выяснение субъединичной структуры представляет определенный интерес.

В литературе накопилось большое количество данных по определению молекулярных весов как ацетилхолинэстеразы, так и псевдохолинэстеразы. Однако они довольно разноречивы из-за различия в выборе объектов, тканей, а также, что очень существенно, методик определения. При ультрацентрифугировании получен молекулярный вес, равный 230000 для очищенной ацетилхолинэстеразы. Молекулярный вес полимерного препарата фермента, определенный различными другими методами, составил 30 млн [1]. По Лейцингеру [11, 12], молекулярный вес очищенного препарата ацетилхолинэстеразы из электрического органа угря равен 260000, фермент имеет димерную структуру с двумя α - и β -цепями. Активный мономер с молекулярным весом 130000 состоит из α - и β -цепей.

Опыты Милара и Графиуса [14] подтвердили значение 260000 молекулярного веса ацетилхолинэстеразы и ее полимерную структуру, однако, по их мнению, фермент состоит из шести субъединиц—каждая с молекулярным весом 42000. Рядом ученых показано, что молекулярный вес ацетилхолинэстеразы колеблется между 220000 и 240000 [6, 15], причем при обработке гуанидином фермент диссоциирует на две частицы с молекулярным весом 102000, а добавление β -меркаптоэтанола приводит к дальнейшей диссоциации ферментной молекулы до субъединиц с молекулярным весом 49000, и эти субъединицы ферментативно не активны [6]. В литературе встречается множество данных по молекулярным весам холинэстеразы сыворотки крови [1, 5, 16]. Молекулярный вес очищенной бутирилхолинэстеразы из сыворотки лошади и человека превышает 200000, при ультрацентрифугировании он составляет примерно 300000, а бутирилхолинэстераза из лошадиной сыворотки, по данным изучения кинетики ингибции, имеет молекулярный вес, равный 750000, что подтверждается результатами, полученными гель-фильтрацией фермента [1]. Ля Мотта и сотр. [8—10] показали, что для изоферментов холинэстеразы сыворотки крови человека характерен взаимопереход, а исследование молекулярного веса показало, что они отличаются на одну и ту же величину, т. е. изоферменты холинэстеразы сыворотки крови человека являются агрегатами одной молекулярной формы.

Из вышесказанного ясно, что литературные данные по молекулярному весу холинэстеразы и ее изоэнзимов весьма разноречивы. Настоящая работа посвящена определению молекулярных весов и изучению субъединичной структуры изоэнзимов холинэстеразы сердца крыс с целью дальнейшего исследования механизма гормональной индукции фермента.

Материал и методика. В работе использованы: комплект реактивов для диск-электрофореза в полиакриламидном геле, эзерин салицилат, 1-нафтилацетат, альбумин, пепсин—все фирмы («Реанал» (ВНР), прочный синий (Fast Blue RR salt), лактатдегидрогеназа—фирмы «Хемапол» (ЧССР), гексакиназа, уреазы—фирмы «Сигма» (США) и додецилсульфат натрия отечественного производства.

Исследования проводились на крысах. Приготовление гомогената, определение холинэстеразной активности и методика электрофореза описаны ранее [2, 4]. Молекулярные веса изоэнзимов определялись по методу Хедрика и Смита [7]. За относительную подвижность бралось отношение расстояний, пройденных белковой фракцией и красителем-меткой (R_m). Определялась зависимость логарифма относительной подвижности ($\lg R_m$) от различных концентраций полиакриламидного геля, которая носила линейный характер. Зависимость наклона ($\lg \alpha$) этих прямых от молекулярных весов стандартных белков дает калибровочную кривую, с помощью которой можно определить молекулярные веса интересующих нас белковых фракций. В качестве стандартных белков использовались: альбумин (мол. вес=65000), пепсин (мол. вес=68000), гексакиназа (мол. вес=100000), лактатдегидрогеназа (мол. вес=135000) и уреазы (мол. вес=483000).

Для количественного определения активности изоэнзимов холинэстеразы проводилась элюция отдельных фракций и определялась активность фермента по окраске на спектрофотометре СФ-4.

Количество наносимого на гель белка определялось по методу Лоури и др. [13].

Результаты экспериментов обработаны статистически с вычислением среднего квадратичного отклонения и доверительного интервала.

Результаты и обсуждение. Была изучена зависимость относительной подвижности (R_m) стандартных белков от различных концентраций геля (4, 6, 7, 7.5 и 10%) для нашей гелевой системы. Результаты экспериментов показали, что наклон прямых, выражающих данную зависимость, с увеличением молекулярного веса белка увеличивается, причем полученные данные хорошо согласуются с литературными [7]. Были поставлены аналогичные эксперименты по определению относительной подвижности (R_m) изоформ холинэстеразы при различных концентрациях полиакриламидного геля (рис. 1). Как видно из рисунка, прямые зависимостей для трех изоферментов холинэстеразы сердца крыс не параллельные, а пересекаются в одной точке, отличной от нулевой концентрации геля. Это свидетельствует о том, что холинэстеразные изоформы сердца крыс отличаются по молекулярным весам, для определения которых на калибровочную кривую наносили значения наклона прямых ($\text{tg}\alpha$) для трех изоформ холинэстеразы. Молекулярные веса определяли графически (рис. 2). Из рис. 2 видно, что изоформу холинэстеразы с

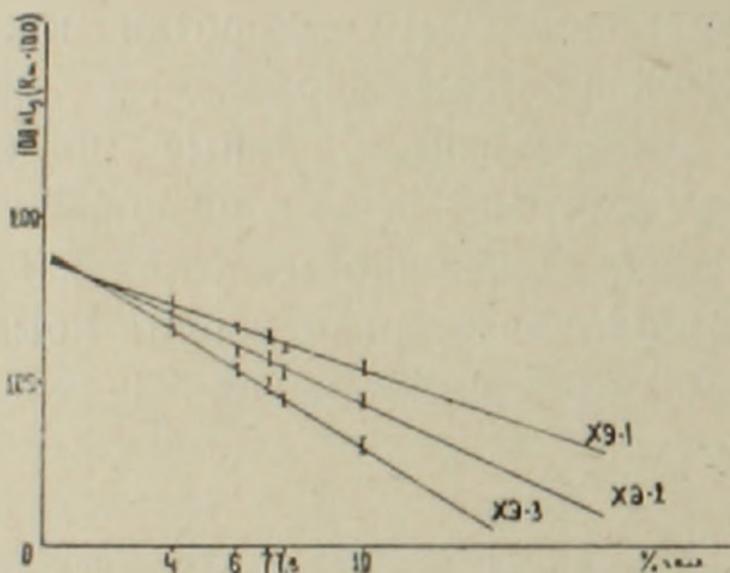


Рис. 1.

Рис. 1. Зависимость относительной подвижности (R_m) трех изоформ холинэстеразы от различных концентраций геля. XЭ-1—изоформ фермента с большей электрофоретической подвижностью; XЭ-2—изоформ фермента со средней подвижностью; XЭ-3—электрофоретически менее подвижный изоформ.

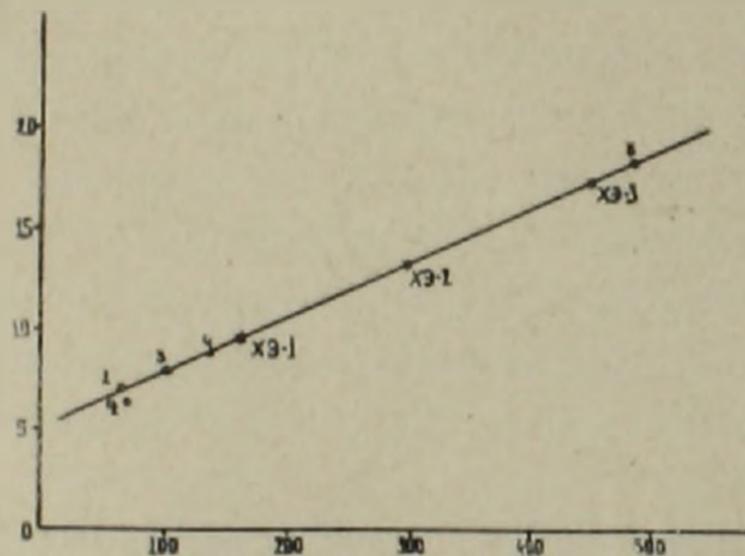


Рис. 2.

Рис. 2. Зависимость наклона ($\text{tg}\alpha$) прямых от молекулярных весов стандартных белков и трех изоформ холинэстеразы. На оси абсцисс—молекулярные веса белков, умноженные на 1000; на оси ординат—значения наклона ($\text{tg}\alpha$) прямых, умноженные на 30. 1—альбумин, 2—пепсин, 3—гексакиназа, 4—лактатдегидрогеназа, 5—уреаза.

большой электрофоретической подвижностью (XЭ-1) соответствует молекулярный вес 160000. У среднего изоформа (XЭ-2) он равен 295000, а электрофоретически менее подвижный изоформ (XЭ-3) имеет молекулярный вес 448000. Учитывая, что методика Хедрика и Смита обеспечивает доверительный интервал $\pm 5\%$, получаем следующие значения молеку-

лярных весов: для ХЭ-1 мол. вес = 160000 ± 8000 (доверительный интервал = $152000 - 168000$); для ХЭ-2 мол. вес = 295000 ± 14700 (доверительный интервал = $280300 - 309700$); для ХЭ-3 мол. вес = 448000 ± 22400 (доверительный интервал = $425600 - 470400$).

Полученные значения хорошо согласуются с литературными данными, в частности с результатами Уильсона и сотр. [18], которые показали, что в сердце эмбриона цыпленка имеется три изоформа фермента, причем среди них доминирует изофермент с меньшей электрофоретической подвижностью (то же самое было показано нами [2]). Молекулярные веса трех изоформ холинэстеразы эмбриона, которые были определены, как и в наших экспериментах, методом Хедрика и Смита, имеют значения, близкие к полученным нами в экспериментах с холинэстеразами сердца взрослых крыс. Так, согласно Уильсону, молекулярные веса изоформ равны: ХЭ-1 = 220000, ХЭ-2 = 300000, ХЭ-3 = 420000. Если сравнить эти данные с нашими результатами, то видно, что значения молекулярных весов второго и третьего изоформ почти одинаковы. Некоторое различие наблюдается только у первого изоформа. Работы Скангель-Крамска и Немерко [17] показывают, что фермент из периферического нерва кролика имеет два изоформа с молекулярными весами 170000 и 310000 соответственно. Предполагается, что тяжелая форма фермента является полимером легкой формы. Интересно, что в геле 10% концентрации появляется и третий, менее подвижный изоформ.

Таким образом, наши исследования показали, что изоформы холинэстеразы сердца крыс имеют разные молекулярные веса, причем они отличаются примерно на 150000 единиц. Интересно выяснить, являются ли эти изоформы полимером одного и того же мономера? Для определения полимерной структуры изоформ нами были поставлены эксперименты по выявлению изоферментов в присутствии Na-додецилсульфата и мочевины. Предварительно было показано, что данные вещества расщепляют белковую молекулу и что с увеличением их концентрации общая активность фермента уменьшается (табл. 1). Так, активность холинэсте-

Таблица 1
Активность холинэстеразы в гомогенатах с различными концентрациями Na-додецилсульфата и мочевины

| Концентрация детергентов | Активность холинэстеразы | |
|--------------------------|--------------------------|-----|
| | ΔD | % |
| — | 115 | 100 |
| 0,12% + 1M | 85 | 74 |
| 0,25% + 2M | 62 | 54 |
| 0,50% + 4M | 20 | 17 |
| 1% + 8M | | 0 |

разы в гомогенате с 1% Na-додецилсульфатом и 8M мочевиной равна нулю, в то время как малые концентрации последних вызывают различ-

ные уменьшения активности фермента. Выявление изоферментов холинэстеразы в присутствии различных концентраций детергентов позволяет определить особенность их расщепления в зависимости от полимерной структуры изозимов. Эксперименты показали, что уменьшение общей холинэстеразной активности на 26% приводит к резкому ослаблению интенсивности третьего, более агрегированного изозима, количество которого уменьшается более чем в три раза, в то время как активность ХЭ-2 и ХЭ-1 даже несколько увеличивается (табл. 2). Уменьшение активности фермента наполовину приводит к исчезновению изозима ХЭ-3;

Таблица 2

Ферментативная активность отдельных изозимов холинэстеразы при уменьшении общей активности фермента, вызванного расщепляющим действием детергентов

| Изозимы ХЭ | Уменьшение общей активности ХЭ, % | | | |
|---------------|-----------------------------------|----|----|----|
| | 0 | 26 | 46 | 83 |
| ХЭ-3 | 50 | 15 | 0 | 0 |
| ХЭ-2 | 20 | 25 | 19 | 0 |
| ХЭ-1 | 35 | 38 | 40 | 19 |

интенсивность второго изозима несколько уменьшается, а количество ХЭ-1 продолжает увеличиваться. Дальнейшее расщепление приводит к тому, что на электрофореграмме остается только довольно слабо выраженный изозим ХЭ-1.

Данные наших экспериментов позволяют заключить, что, по-видимому, Na-додecilсульфат с мочевиной вызывают расщепление более агрегированных форм фермента на менее агрегированные, причем уменьшение более агрегированных форм происходит с некоторым увеличением низкополимерных изозимов, что свидетельствует о ступенчатом характере расщепляющего действия детергентов.

Таким образом, эксперименты по выявлению изозимов холинэстеразы в присутствии детергентов позволяют предположить, что они являются полимерами одного и того же мономера, так как, расщепляясь, переходят друг в друга. Учитывая, что молекулярные веса изозимов холинэстеразы отличаются примерно на 150000 единиц, можно предположить, что мономер фермента имеет молекулярный вес 75000—80000 и что выявленные нами изоферменты (ХЭ-1, ХЭ-2, ХЭ-3) являются соответственно димером, тетрамером и секстамером. Проводятся дальнейшие исследования по проверке данного предположения.

Ереванский государственный университет,
кафедра биофизики

Поступило 15.V 1973 г.

Է. Ս. ԳԵՎՈՐԳՅԱՆ, Գ. Հ. ՓԱՆՈՍՅԱՆ

ԱՌՆԵՏՆԵՐԻ ՍՐՏԻ ԽՈՒԻՆԷՍԹԵՐԱԶԻ ԻԶՈԶԻՄՆԵՐԻ ՄՈԼԵԿՈՒԼԱՐ
ԿՇԻՌՆԵՐԻ ՇՈՒՐՁ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Որոշված են առնետների սրտի խոլինէսթերազի երեք իզոզիմների մոլեկուլյար կշիռները և ցույց է տրված, որ վերջիններս միմյանցից տարբերվում են մոտ 150000 միավորով: Իզոֆերմենտների հայտնաբերումը Na-դոզեցիլսուլֆատի և միզանյութի առկայությամբ ցույց է տալիս, որ, ըստ երևույթին, խոլինէսթերազի իզոզիմները իրենցից ներկայացնում են միևնույն մոնոմերի պոլիմերներ: Ենթադրվում է, որ նրանք միևնույն՝ 75000—80000 մոլեկուլյար կշիռ ունեցող ոչ ակտիվ մոնոմերի դիմեր, տետրամեր և սեկստամեր ձևերն են:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Аугустинссон К. Б. Бюлл. Всем. орган. здрав., 44, 1—2—3, 81—99, 1972.
2. Геворкян Э. С., Марилян Г. Г., Паносян Г. А. Биологический журнал Армении, 26, 3, 61—66, 1973.
3. Паносян Г. А., Геворкян Э. С., Даниелян Т. С. Тез. докл. Всесоюзн. конф., посв 70-летию Х. С. Коштоянца, Ереван, 1971.
4. Паносян Г. А., Геворкян Э. С., Даниелян Т. С., Назарян К. Б. Биологический журнал Армении, 25, 2, 40—46, 1972.
5. Boutin D., Brodeur J. Can. J. Physiol. Pharmacol. 49, 8, 777—779, 1971.
6. Froede H. C., Wilson I. B. Isr. J. Med. Sci. 6, 2, 179—184, 1970.
7. Hedrick J. L., Smith A. J. Arch. Biochem. Biophys., 126, 1, 155—164, 1968.
8. La Motta R. V., McComb R. B., Noll C. R. et. al. Arch. Biochem. 124, 299, 1968
9. La Motta R. V., Woronick Ch. L. Clin. Chem., 17, 3, 135—144, 1971.
10. La Motta R. V., Woronick Ch. L., Reinfank R. F. Arch. Biochem., 136, 448, 1970.
11. Leuzinger W. Cholinergic Ligand Interactions Proc. Symp. 19—31, 1970 (Pub 1971).
12. Leuzinger W., Goldberg M., Cauvin E. J. Mol. Biol., 40, 2, 217—255, 1969.
13. Lowry O. H., Rosenbough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., 193, 265, 1951.
14. Millar D. B., Graflus M. A. FEBS letters 12, 61, 1970.
15. Pavlic M., Wilson I. B. In Yugoslav. Physiol. Pharmacol. Acta, 6, 1, 77—81, 1970.
16. Scott E. M., Powers R. F. Nature, New Biol. 236, 64, 83—84, 1972.
17. Skangtel-Kramaska I., Nlemierko S. Bull. Acad. Pol. Sci., 19, 6, 389, 1971.
18. Wilson B. W., Metter M. A., Asmundson R. A. J. Exp. Zool., 172, 49, 1969.