

ИССЛЕДОВАНИЕ КИНЕТИКИ ТЕРМОИНАКТИВАЦИИ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ МОЗГА КРЫС И БУТИРИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ СЫВОРОТКИ КРОВИ ЛОШАДИ

СЭПП А. В., КРАУЗБЕРГ Т. Х., ЯРВ Я. Л.

Изучена кинетика термоинактивации водорастворимой бутирилхолинэстеразы сыворотки крови лошади и мембраносвязанной АХЭ мозга крыс. Показано, что кинетика термоинактивации обоих этих ферментов описывается суммой двух процессов первого порядка, которые характеризуются разными значениями констант скорости. Доли «быстро» и «медленно» инактивирующегося фермента зависят от температуры опыта. Вычислены значения активационных параметров для обеих стадий денатурации и обсуждаются возможные причины уменьшения скорости в ходе денатурационного процесса. Высказано предположение о том, что денатурированные при нагревании белки способны в результате разворачивания белковой глобулы более интенсивно взаимодействовать с нативными молекулами фермента, повышая тем самым их термостабильность. Доли «быстро» и «медленно» инактивирующегося фермента определяются в таком случае кинетическими параметрами процессов термоденатурации и образования ассоциатов нативного и денатурированного белков.

Процесс термоинактивации мембраносвязанной АХЭ эритроцитов не подчиняется кинетике реакции первого порядка и в интервале температур от 47° до 58° протекает по меньшей мере в две стадии [1], которые различаются по константам скорости и активационным параметрам. От температуры зависит также отношение долей быстро и медленно инактивирующегося препарата. Эти результаты были объяснены двумя альтернативными возможностями, учитывающими протекание процесса в двух следующих друг за другом этапах, либо существованием двух, денатурирующихся с разной скоростью, форм фермента [1]. При этом возможно, что сложное кинетическое поведение АХЭ эритроцитов в процессе термоинактивации обусловлено взаимодействием этого белка с мембранной структурой, о чем свидетельствует тот факт, что для солиubilизации АХЭ мембран эритроцитов необходима обработка этого белково-липидного комплекса ионными детергентами [2].

В настоящей работе поставлена задача исследования кинетики термоинактивации двух разных холинэстераз: мембраносвязанной АХЭ мозга крыс и водорастворимой бутирилхолинэстеразы (БХЭ) сыворотки крови лошади. Оба эти фермента имеют субъединичное строение [3, 4], и их субъединицы характеризуются величиной M . Так как сывороточный фермент истинно растворим в воде, его свойства, в том числе и законо-

мерности процесса термоденатурации, не искажены белково-липидными взаимодействиями. Можно предположить, что сопоставление данных термонинактивации холинэстераз мозга и сыворотки позволяет оценить роль липидного компонента в определении свойств и стабильности мембраносвязанного фермента.

Материалы и методы

Препарат БХЭ сыворотки крови лошади с уд. акт. 130 Е/мг был предоставлен Институтом вакцины и сывороток им. Мечникова (Москва). Мембранный препарат АХЭ получали из коры больших полушарий головного мозга крыс. Ткань обрабатывали при $+4^{\circ}$ в гомогенизаторе из плексигласа (3 мин при 1000 об/мин). Приготовленный на 0.1 М фосфатном буфере (рН 7.4), гомогенат центрифугировали 10 мин для удаления кусков ткани и ядер на центрифуге К-24 при 1000 g. Супернатант подвергали второму центрифугированию при 100000 g (45 мин) на ультрацентрифуге VAC-602. Осадок промывали 0.05 М фосфатным буфером и гомогенизировали повторно там же для получения микросомной фракции мембран.

Активность обеих холинэстераз измеряли в 0.05 М фосфатном буфере (рН 7.4), спектрофотометрически [5] на спектрофотометре Perkin Elmer 402. Концентрация субстрата (ацетилхолин йодистый, ч. д. а.) в реакционной среде—20 мМ; концентрация 5,5'-динитробис (2-нитробензойной кислоты) (ч., «Рсахим») —0.3 мМ. Измерения начальной скорости гидролиза субстрата проводили при 25° при $\lambda=412$ нм.

Опыты по денатурации ферментов осуществляли в термостатированных стеклянных реакторах, которые были снабжены термометром для контроля температуры, при постоянном интенсивном перемешивании, объем реакционной среды—от 1.5 до 10 мл.

В начале эксперимента необходимый объем буферного раствора нагревали до нужной температуры. Затем в реактор вводили раствор фермента, подбирая такие соотношения объемов, чтобы уменьшение температуры реакционной среды не превышало $0.1-0.2^{\circ}$. В определенное время из реактора отбирали аликвоты и быстро охлаждали в погруженных в ледяную воду пробирках для прекращения процесса денатурации. В этих пробах определяли активность исследуемых ферментов, как описано выше.

Титрование растворов БХЭ для определения активности фермента проводили методом Berge [6]. Используемые реактивы и детали методики титрования описаны ранее [7].

Обработку кинетических данных и их статистический анализ проводили на мини-ЭВМ «Искра-1256».

Результаты и обсуждение

Нагревание растворов БХЭ сыворотки крови лошади и АХЭ мозга крыс приводит к необратимой инактивации этих ферментов, скорость которой зависит от температуры. Это допускает проведение опытов

только в интервале от 50° до 60° в случае АХЭ и от 55° до 65° в случае БХЭ. При одинаковой температуре быстрее инактивируются АХЭ (рис. 1). Следовательно, наличие связи этого белка с мембранной структурой не является фактором, повышающим термостабильность фермента.

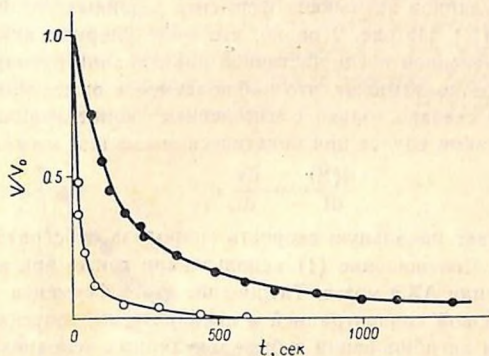


Рис. 1. Термоинактивация бутирилхолинэстеразы (●) и ацетилхолинэстеразы (○) при 60° в 0,05 М фосфатном буфере с pH 7,4

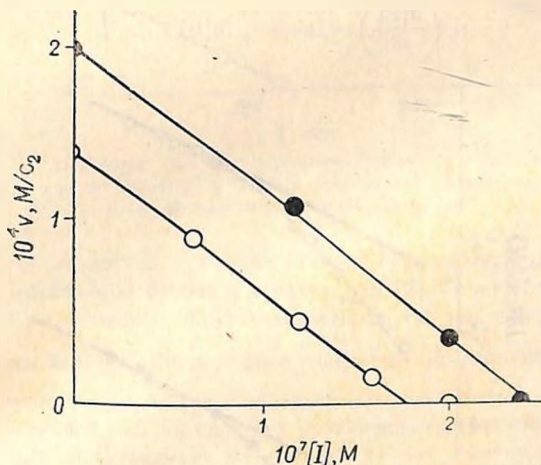


Рис. 2. Титрование нативной (●) и частично инактивированной (○) бутирилхолинэстеразы O,O-диэтил-п-нитрофенилфосфатом

Изучение активности холинэстераз проводили при высоких концентрациях субстрата, где скорость реакции определяется, в основном, каталитической константой и концентрацией активных центров фермента. Для выяснения, какая из этих величин меняется в процессе термоинактивации, проводили титрование нативного и частично инактивированного препаратов БХЭ. В качестве титранта использовали необратимый ин-

гибитор О, О-диэтил-п-нитрофенилфосфат. Результаты титрования представлены на рис. 2 в виде зависимости остаточной активности фермента после окончания реакции ингибирования от концентрации ингибитора. Отрезок абсциссы на этом графике равен концентрации активных центров фермента в реакционной среде, и наклон прямой характеризует величину молекулярной активности фермента в данных условиях эксперимента, $a_m = v/[E]$. Из рис. 2 видно, что молекулярная активность БХЭ остается неизменной после частичной инактивации препарата при 60°. Эти результаты показывают, что наблюдаемое в опыте уменьшение активности БХЭ связано только с изменением концентрации активного фермента. В таком случае при кинетическом анализе можно принять

$$\frac{d(E)}{dt} = \frac{dv}{dt}, \quad (1)$$

где v обозначает начальную скорость гидролиза субстрата в стандартных условиях. Соотношение (1) использовали также при анализе кинетики инактивации АХЭ мозга. Титрование этого фермента затруднено в связи с его низкой концентрацией в препарате, не допускающей проведения реакции ингибирования в бимолекулярных условиях.

Для определения кинетического порядка процесса термоннактивации холинэстераз исходили из известного уравнения [8]:

$$\ln \left(\frac{d[E]}{dt} \right) = \ln k + n \cdot \ln [E], \quad (2)$$

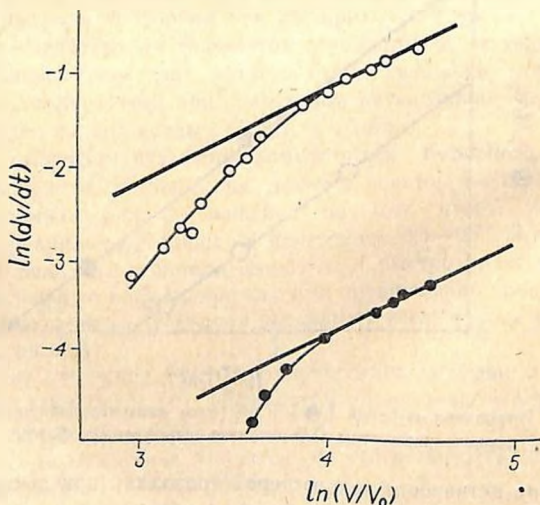


Рис. 3. Определение порядка реакции термоннактивации бутирилхолинэстеразы при 55° (●) и 60° (○)

в котором вместо концентрации фермента $[E]$ использовали начальную скорость гидролиза субстрата v или относительную величину v/v_0 . При этом, исходя из уравнения (2):

$$\ln \left(\frac{dv}{dt} \right) = \text{const} + n \cdot \ln \left(\frac{v}{v_0} \right). \quad (3)$$

Примеры обработки кинетических кривых инактивации БХЭ, согласно этому уравнению, приведены на рис. 3. В начальный период инактивация фермента подчиняется кинетике первого порядка, однако в ходе реакции наблюдается отклонение кинетических кривых от этой закономерности. Аналогичные результаты получены также в случае АХЭ мозга. Такое сложное кинетическое поведение является характерным для многих белков, у которых отклонение процесса денатурации от кинетики первого порядка часто объясняют существованием двух или

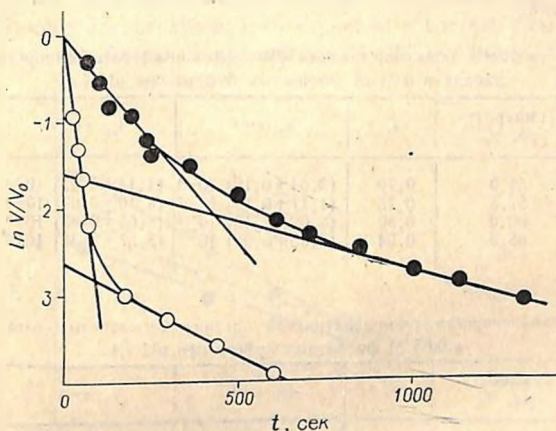


Рис. 4. Обработка кривых термоденатурации бутирилхолинэстеразы (●) и ацетилхолинэстеразы (○) в координатах кинетического уравнения реакции первого порядка при 60°

большого числа последовательных реакций первого порядка, или разветвленным механизмом процесса денатурации [9]. Те же объяснения применимы и в случае изученных холинэстераз, так как обработка результатов в координатах кинетического уравнения первого порядка $\ln \left(\frac{v}{v_0} \right)$ и t дает кривую с двумя прямолинейными участками (рис. 4). Независимо от конкретной модели процесса инактивации фермента (последовательные или параллельные пути реакции) наблюдаемая картина может быть описана кинетическим уравнением:

$$\left(\frac{v}{v_0} \right) = a_1 e^{-k_1 t} + a_2 e^{-k_2 t}. \quad (4)$$

При достаточно разных значениях констант k_1 и k_2 их значения можно рассчитать из наклонов линейных участков зависимости $\ln \left(\frac{v}{v_0} \right)$ от t . Результаты анализа приведены в табл. 1 и 2.

Экстраполяция получаемых в координатах $\ln \left(\frac{V}{V_0} \right)$ и t прямых к $t=0$ позволяет точно оценить доли «быстро» и «медленно» инактивирующегося фермента α_1 и α_2 (табл. 1, 2). Доля быстро инактивирующегося фермента определяется температурой опыта. Кроме того, было замечено, что соотношение концентраций быстро и медленно инактивирующейся БХЭ зависит от общей концентрации белка в инкубационной смеси. При этом уменьшение концентрации белка дестабилизирует фермент, в связи с чем во всех опытах по определению активационных параметров процесса термоденатурации использовали одинаковые концентрации белка.

Таблица 1

Константы скорости термининации бутирилхолинэстеразы сыворотки крови лошади в 0,05 М фосфатном буфере при pH 7,4

Температура, °C	α_1	$k_1, \text{с}^{-1}$	$k_2, \text{с}^{-1}$
55,0	0,70	$(3,64 \pm 0,19) 10^{-4}$	$(1,14 \pm 0,27) 10^{-4}$
57,5	0,75	$(1,11 \pm 0,12) 10^{-3}$	$(4,10 \pm 0,67) 10^{-4}$
60,0	0,80	$(5,02 \pm 1,10) 10^{-3}$	$(8,65 \pm 0,87) 10^{-4}$
65,0	0,94	$(5,85 \pm 0,98) 10^{-2}$	$(5,57 \pm 2,31) 10^{-3}$

Таблица 2

Константы скорости термининации ацетилхолинэстеразы мозга крыс в 0,05 М фосфатном буфере при pH 7,4

Температура, °C	α_1	$k_1, \text{с}^{-1}$	$k_2, \text{с}^{-1}$
50,0	0,20	$(1,06 \pm 0,15) 10^{-3}$	—
52,5	0,55	$(2,90 \pm 0,19) 10^{-3}$	—
55,0	0,70	$(4,15 \pm 0,51) 10^{-3}$	$(3,48 \pm 1,98) 10^{-4}$
57,5	0,81	$(9,09 \pm 3,50) 10^{-3}$	$(7,45 \pm 2,31) 10^{-4}$
60,0	0,93	$(3,14 \pm 0,81) 10^{-2}$	$(2,12 \pm 0,19) 10^{-3}$

Для описания температурной зависимости констант скорости инактивации холинэстераз использовали уравнение Арренюса:

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{RT} \quad (5)$$

Это уравнение соблюдается в случае обеих холинэстераз и допускает расчет величины E_a процесса инактивации (рис. 5). Процесс инактивации холинэстераз характеризуется высокими значениями E_a , которые приведены в табл. 3. Судя по литературным данным [9], подобные высокие значения активационной энергии являются весьма характерными для денатурации белков. Согласно общим представлениям о механизме и характере изменения строения белков в процессе их денатурации, предполагают, что величина E_a зависит от природы и количества разрываемых при денатурации связей [9]. Высокие значения E_a свидетельствуют о разрыве большого числа слабых и, вероятно, не Kooperативных взаимодействий. Разрыв небольшого числа сильных и кооперативных

взаимодействий приводит к относительно низким значениям E_a . Применяя эти выводы в отношении холинэстераз, можно утверждать, что термоннактивация БХЭ сопровождается разрывом большого числа слабых связей, поддерживающих нативную структуру фермента. Полученные результаты свидетельствуют также о том, что связь белка с липидной мембраной, очевидно, уменьшает число критических взаимодействий, разрыв которых приводит к инактивации фермента, где определенную роль могут играть свойства мембраны, также зависящие от температуры. Зависимость ряда физико-химических параметров мембран может быть описана функцией типа уравнения Аррениуса [10]. Получаемые при этом эффективные значения E_a зависят как от природы наблюдаемого процесса, так и от строения и состава мембран. Эти активационные параметры не превышают 15—17 ккал/моль, что значи-

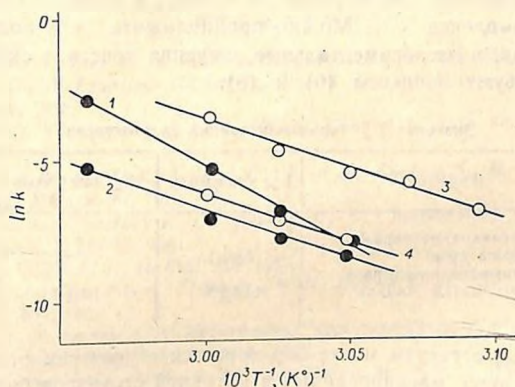
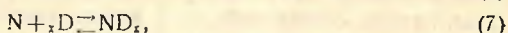


Рис. 5. Определение величины E_a для первой и второй стадий процесса термоннактивации бутирилхолинэстеразы (1 и 2) и ацетилхолинэстеразы (3 и 4)

тельно ниже E_a для термоденатурации мембраносвязанной АХЭ. Интересно добавить, что в этом интервале значений E_a находится активационная энергия 13,8 ккал/моль, полученная для процесса термоннактивации мускаринового холинорецептора мозга [12]. Учитывая результаты опытов по солюбилизации этого мембранного белка [13], можно заключить, что рецепторный белок связан с мембранной структурой очень тесно, и его стабильность определяется, в основном, состоянием липидного бислоя.

Как видно из табл. 3, значения E_a начальной и конечной стадий процесса термоннактивации АХЭ, а также конечной стадии термоннактивации БХЭ близки. Исключением является начальный период термоденатурации растворимой БХЭ, для которого значение $E_a = 114$ ккал/моль отличается от остальных величин E_a . По-видимому, только этот процесс протекает в условиях, значительно отличающихся по ха-

рактеру взаимодействий нативного белка с окружением. Можно объяснить изменения наблюдаемой активационной энергии в ходе процесса денатурации БХЭ образованием между нативными (N) и уже денатурированными (D) молекулами белка комплексов (агрегатов), ND_x , стабилизирующих нативный белок.



Согласно этой схеме, наблюдаемые кинетические закономерности определяются скоростью денатурации N и ND_x , а также условиями образования комплекса ND_x . Можно предположить, что последняя реакция быстрая, и экспериментальные значения констант скорости k_1 и k_2 характеризуют процессы (6) и (8).

Таблица 3

Значения E_a^- термoinактивации холинэстераз

Фермент	E_a^1 , ккал/моль	E_a^2 , ккал/моль
Ацетилхолинэстераза мозга крыс	68 ± 15	78 ± 19
Бутирилхолинэстераза сыворотки лошади	114 ± 8	73 ± 17

Описанные агрегаты могут образоваться с участием разных функциональных групп, маскированных в нативной структуре белка и освобождающихся только при разворачивании его глобулярной структуры в процессе денатурации. Вероятно, что в качестве стабилизирующего компонента могут выступать любые белки, которые денатурируются в данных условиях. Реакционной схемой (6—8) можно объяснить также кинетику денатурации АХЭ мозга, однако в этом случае E_a для стадий (6) и (8) одинакова. Следовательно, количество тех решающих взаимодействий, которые определяют стабильность белка в состояниях N и ND_x , существенно не меняется, в чем может сказываться роль связи этого белка с мембранной структурой.

THERMAL INACTIVATION OF ACETYLCHOLINESTERASE FROM RAT BRAIN AND BUTYRYLCHOLINESTERASE FROM HORSE SERUM

SEPP A. V., KRAUSBERK T. H., JÄRV J. L.

Chair of Organic Chemistry, State University, Tartu, Estonian SSR

The kinetics of thermal inactivation of two different cholinesterases, the membrane-bound acetylcholinesterase from rat brain and the water-soluble butyrylcholinesterase from horse serum has been investigated at

various temperatures. For both enzymes the inactivation reaction can be described as a combination of two first-order processes with different rate constants. These rate constants as well as the ratio of the rapidly and slowly inactivating enzyme quota depend strongly upon temperature. The activation energy (E_a) for the initial step of butyrylcholinesterase inactivation is remarkably high, that of the slow step is lower and is close to the appropriate values for both slow and rapid steps of acetylcholinesterase inactivation. This great change of the reaction rate during the denaturation process as well as the change of the E_a in the case of butyrylcholinesterase may be explained by formation of a complex between the native and denatured protein molecules that stabilizes the native protein against thermal inactivation.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Coleman M. H., Eley D. D. *Biochim. Biophys. Acta*, **67**, 646—657, 1963.
2. Brodbeck U., Di Francisco C., Ott P. *Proc. 3 Meeting Europ. Soc. Neurochem.*, 548—550, 1980.
3. Trevor A. J., Gordon M. A., Parker K. K., Chan S.-L. *Life Sci.*, **23**, 1209—1220, 1978.
4. Teng T.-L., Harpst J. A., Lee J. C., Zinn A., Carlson D. M. *Arch. Biochem. Biophys.*, **176**, 71—81, 1976.
5. Ellmann G. L., Courtney K. D., Andres Jr. V., Featherstone R. M. *Biochem. Pharmacol.*, **7**, 88—95, 1961.
6. Berry W. *Biochem. J.*, **49**, 615—620, 1951.
7. Яро Я. Л., Аавиксаир А. А., Годовиков Н. Н., Лангел Ю. Л., Пастъ Э. Э. *Биохимия*, **41**, 827—835, 1976.
8. Березин И. В., Клесов А. А. *Практический курс химической и ферментативной кинетики*, М., Изд-во МГУ, с. 6—8, 1976.
9. Жолд М. *Физическая химия денатурации белков*, М., Мир, с. 212—350, 1968.
10. Cossins A. R. *Biochem. Biophys. Acta*, **470**, 395—411, 1977.
11. Graziana V., Livne A. J. *Membrane Biol.*, **7**, 275—284, 1972.
12. Лангел Ю. Л., Ринкен А. А., Тяхепылд Л. Я., Яро Я. Л. *Нейрохимия*, **1**, 343—352, 1982.
13. Hurko O. *Arch. Biochem. Biophys.*, **190**, 434—445, 1978.

Государственный
университет, Тарту

Поступила 26. VII 1982