

Л. О. Ягодина

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ЭЛЛМАНА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КИНЕТИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ РЕАКЦИИ, КАТАЛИЗИРУЕМОЙ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗОЙ КРЫС *RATUS NORVEGICUS*

Ключевые слова: ферментативная кинетика, ингибирование, ацетилхолинэстераза.

Определена область квазистационарности реакции гидролиза ацетилхолина ферментом AChE (ацетилхолинэстераза) из экстрактов локомоторных мышц и головного мозга крыс. Выделен стационарный участок эстеразной реакции, полученной на экстрактах тканей. Показано, что ингибитор прозерин неселективен для AChE из головного мозга и мышцы EDL, константа ингибирования составляет $K_i^{(\text{прозерин})} = 0,4 \cdot 10^{-5} \text{ М}$. Прединкубация мышечных (EDL) экстрактов с ферментом коллагеназой существенно влияет на начальную скорость реакции, катализируемой AChE

Keywords: enzyme kinetics, inhibition, acetylholinesterase.

*The reaction of acetylthioholin hydrolysis catalysed by AChE from brain and EDL of ruts *Rutus Norvegicus* has been investigated. The inhibition constants for neostigmin of AChE from extractshave have been determinate and consist of $K_i^{(\text{neostigmin})} = 0,4 \cdot 10^{-5} \text{ М}$*

Введение

Ацетилхолинэстераза (AChE) КФ 3.1.1.7. (ацетилхолин – ацетилгидролаза) – фермент класса гидролаз, катализирующий гидролиз ацетилхолина, а также других эфиров холина, обладает гидролазной функцией. Ферментативная реакция, катализируемая ацетилхолинэстеразой, заключается в гидролизе нейромедиатора ацетилхолина:

Ацетилхолин – AChE → Холин + Уксусная кислота

Первичная структура AChE включает 543 остатка и практически не имеет отличий для белков из тканей разных органов одного организма. Активный центр AChE включает функциональный His 447, Ser 203, Glu 334 и консервативен для всех организмов. Физиологическая роль AChE состоит в ограничении действия нейромедиатора – ацетилхолина, секретлируемого из нервного окончания в синаптическую щель, составленную постсинаптической и пресинаптической мембраной. В нервно-мышечном синапсе в норме ацетилхолин действует на постсинаптическую мембрану короткое время (1—2 мс), и сразу же начинает разрушаться под действием ацетилхолинэстеразы. Ацетилхолинэстераза присутствует в центральной нервной системе (преимущественно в области постсинаптических мембран), а также в эритроцитах, электрических органах рыб и в змеином яде. В случае полной инактивации AChE на постсинаптической мембране происходит чрезмерное накопление в нервной клетке ацетилхолина, что приводит к блокированию передачи нервных импульсов. Исходя из этого ясно, что вещества, способные угнетать активность AChE, обладают высокой токсичностью и крайне вредны. Однако, известны и нетоксичные или малотоксичные ингибиторы AChE, применяющиеся в медицине при болезни Паркинсона и ряде других заболеваний, сопровождающихся нарушениями нервно-мышечной проводимости. Ферментативная активность AChE традиционно определяется методом Эллмана [1], согласно которому измеряется восстановление ацетилтиохолина до холина с отщеплением ацетата, произошедшее за время 30 минут, по специфическому окрашиванию реагентом

DTNB (5,5'-дитиобис-(2-нитробензойной кислоты) на ацетат. Активность AChE по Эллману определяется в клинических лабораториях при диагностировании ряда заболеваний и как маркерная реакция на присутствие фосфоорганических ингибиторов фермента – AChE в промышленных отходах, сточных водах [2,3]). Исходя из ключевой роли AChE в механизме нервной проводимости, становится понятной актуальность исследований не только ее функциональной активности, но и кинетических параметров реакции, в частности, кинетики ингибирования AChE. Задачей данной статьи было определить границы выполнимости условий квазистационарности реакции Эллмана для мышцы m. extensor digitorum longus (EDL) и головного мозга крыс линии Вистар с целью проверки применимости данной реакции для определения равновесных кинетических параметров, таких как начальная скорость реакции и константа ингибирования AChE.

Материалы и методы

Использовали ингибиторы бутирилхолинэстеразы (BuChE) iso-OMPA (Tetra(monoisopropyl)pyrophosphortetramide) [4] и ацетилхолинэстеразы (AChE) прозерин (neostigmin) фирмы Sigma. Эстеразы из головного мозга и мышцы EDL крыс получали экстрагируя в гомогенаторе Поттера предварительно замороженный в жидком азоте целевой объект, добавляя 3-х кратный объем буфера А: 10 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 0,5% Tween 20, 10 mM MgCl₂, 2 mM EDTA. После добавления 0,02% Полимина Р гомогенаты инкубировали в течение 15 минут на льду, затем центрифугировали 10 000 об/мин 20 минут для удаления клеточных обломков и ДНК. Реакционная смесь для определения эстеразной активности содержала 1 mM ацетилтиохолина, 1,2 mM DTNB, 5-30 мкл клеточного экстракта (1 мг/мл белка в кювете), 0,1 M К-фосфатный буфер pH 8,0; t = 36°C. Реакцию, катализируемую бутирилхолинэстеразой (BuChE), ингибировали добавлением специфического ингибитора $2 \cdot 10^{-5} \text{ М}$ iso-OMPA. Все исходные растворы готовили непосредственно перед опытом, все используемые реагенты изготовлены

фирмой Sigma. Реакцию запускали добавлением субстрата - ацетилтиохолина после 5 минутного инкубирования экстракта с ингибиторами в реакционной смеси в термостатируемой кювете при 36°C. Кинетику ферментативной реакции восстановления ацетилтиохолина AChE исследовали дифференциальным методом по измерению оптической плотности при 412 nm, пропорциональному концентрации одного из продуктов (ацетат), в условиях ингибирования бутирилхолинэстеразы. Измерения скорости реакции, катализируемой AChE, проводили на спектрофотометре Perkin-Elmer (USA) в 1 см термостатируемой кювете при 36° С. В опытах по определению границ стационарности реакции записывали полные кинетические кривые A(t) от начала реакции до выхода на плато. Текущие скорости реакции ($v=\Delta A/\Delta t$) рассчитывали как касательные к кинетической кривой в определенной точке. В опытах по определению констант ингибирования определяли начальные скорости реакции по наклону линейного участка кинетической кривой A(t), в интервал времени от 5 до 30 с от начала реакции. Концентрацию белка в экстрактах определяли по методу Брэдфорда [5]. pH растворов определяли на pH-метре ОР-204/1 с точностью 0,02 ед. в термостатируемой ячейке при 36°C.

Результаты и их обсуждение

С целью определения квазистационарных условий реакции, регистрируемой по методу Элмана, нами были записаны полные кинетические кривые A(t) от начала реакции (t=0) до выхода на плато, при этом скорость реакции $\Delta A/\Delta t$ определяли вдоль всей кинетической кривой.

На рис.1 и 2 представлены полные кинетические кривые A(t) реакции, катализируемой AChE из экстрактов головного мозга и мышцы EDL крысы, полученные усреднением по данным 11 независимых биологических экспериментов при трех повторных регистрациях. Как видно из рис. 1 и 2, реакция в случае экстрактов из EDL и головного мозга стационарна как минимум в течение 5 минут. Относительное содержание AChE к общему белку, очевидно, выше в экстрактах головного мозга, однако, как видно из рисунка, наиболее выражена стабильность реакции катализируемой AChE из мышцы EDL. Данную особенность кинетического поведения реакции из EDL можно объяснить структурными различиями якорных белков, *in vivo* присоединяющих AChE к постсинаптической мембране в мышцах и мозге [6,7]. Несмотря на консервативность активного центра и практически отсутствие различий в первичной последовательности и пространственной структуре AChE из различных органов, время выхода на плато кинетических кривых, описывающих ферментативную реакцию AChE, различается для мышц, мозга (рис.1 и 2) и, как показано ранее [7] сердца. Возможно, что различие в длительности квазистационарного участка ферментативной реакции AChE для разных органов связано с тем, что AChE работает в клетках в виде ассоциатов из мономеров, димеров и тетрамеров AChE с различными коллагеноподобными белками, для нервно-мышечного синапса – это ColQ, для головного мозга – Prima (пролинбогатый белок). Причем в

мышцах 1, 2 или 3 тетрамера AChE могут связываться с тремя переплетенными коллагеноподобными «хвостами» (Col Q), образуя ассиметричные формы AChE, обозначаемые G2, G4 и A12, в зависимости от числа мономеров AChE [5].

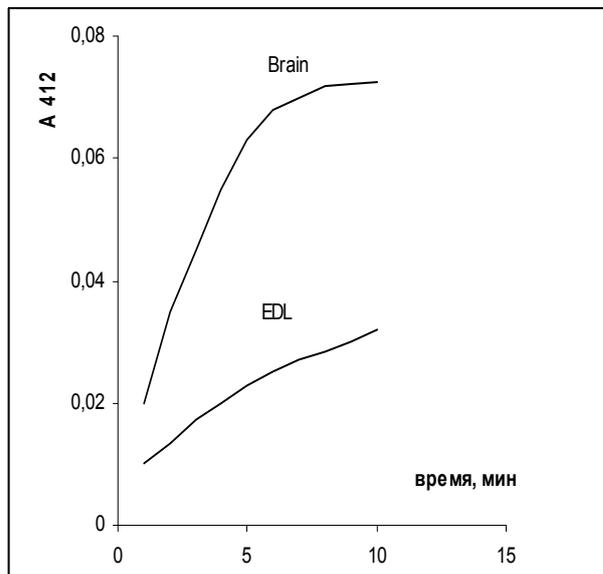


Рис. 1 – Экспериментальные кривые реакции гидролиза ацетилтиохолина эстеразой AChE, содержащейся в экстрактах головного мозга и *m. extensor digitorum longus* (EDL): К-фосфатный буфер, $2 \cdot 10^{-5}$ M iso-OMPA, общий белок 1 мг/мл, pH 8,0; 36°C

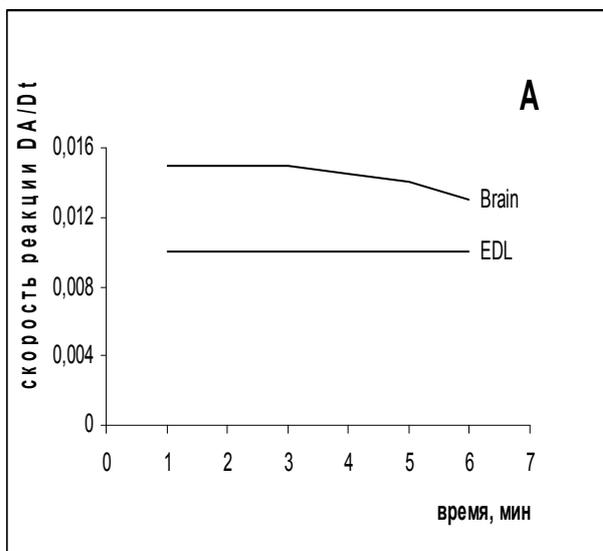


Рис. 2 – Зависимость скорости реакции, катализируемой AChE из экстрактов, от времени регистрации реакции

Поскольку AChE из головного мозга и мышцы является сложной молекулой – гетероолигомером, в которой присутствуют различающиеся по составу и форме пролин - богатые коллагеновые структуры (ColQ в локомоторных мышцах и PRIMA в головном мозге), мы решили проверить влияние С-547 на активность AChE после разрушения коллагеноподобных структур в результате разрезания их коллагеназой. Фермент коллагеназу (КФ 3.4.24.7) брали в концентрации 0,2 мг/мл и инкубировали с экстрактами EDL и мозга крыс различное время до запуска ре-

акции ацетилтиохолином. Использовали реакционную среду: 5 мМ АТCh, 10 мМ DTNB, $2 \cdot 10^{-5}$ М iso-OMPA, 0,1 М К-фосфатный буфер, pH 8,0, t = 36 °С. Как следует из приведенных нами данных (табл. 1), активность АСhЕ под действием коллагеназы в экстрактах из мышцы EDL уменьшается в 2 раза за время прединкубации 30 минут. Этот результат косвенно подтверждает наше предположение [7] о существенной роли коллагенового хвоста в олигомере АСhЕ в экстрактах из EDL.

Таблица 1 – Начальная скорость реакции АСhЕ в локомоторной мышце EDL и мозге в зависимости от времени инкубации с коллагеназой (0,2 мг/мл)

орган или ткань крысы	реакция без коллагеназы	коллагеназа 20 минут	коллагеназа 30 минут
головной мозг	0.0761±0,002	0.0759±0,002	0.0558±0,003
EDL	0.0678±0,003	0.0601±0,002	0.0349±0,003

Как показано ранее [8], белок ColQ (коллагеновый хвост АСhЕ) заякоривается в постсинаптической мембраной нервно-мышечного синапса, и имеет 8 вариантов альтернативного сплайсинга а, кроме того, множество мутаций, каждая из которых приводит к серьезным заболеваниям - миопатиям и миостениям. Очевидно, что АСhЕ, поскольку она находится на внешней стороне мембраны синапса, функционирует в условиях высоких локальных концентраций ионов, причем АСhЕ не относится к мембрансвязанным ферментам – она не интегрирована с мембраной, а прикрепляется за счет ColQ. АСhЕ является внеклеточным белком, поскольку функционирует в синаптической щели. Попробуем оценить, что может значительно влиять на скорость реакции, катализируемого АСhЕ *in vivo*. Одним из самых сильных вариантов регуляции активности АСhЕ в EDL может служить регуляция трехмерного пространственного расположения глобулы АСhЕ в гетероолигомере, образованном с молекулой ColQ. В этом случае 1 молекула ингибитора, занимающая положение вблизи контакта АСhЕ с пролин-богатой областью ColQ, способна повлиять на активность $4 \times 3 = 12$ глобул АСhЕ, что может привести к чрезвычайно высокой чувствительности АСhЕ в форме А12 преимущественно присутствующей в EDL. В пользу высказанного предположения косвенно свидетельствует, результат сравнительного анализа участка структуры ColQ и PRIMA, непосредственно контактирующего с WAP (W-W-W-триптофан богатой) областью АСhЕ в гетероолигомерах А12 для EDL и G4 для головного мозга. Последовательности ColQ и PRIMA выравниваются вне участка контакта с АСhЕ (вне W-W-W триптофан богатой области АСhЕ) [8]. В области WAP контакта АСhЕ с Prima имеется повторность из 10 циклизующихся не заряженных пролинов, тогда как контакт WAP АСhЕ с ColQ со стороны ColQ содержит три пролина (р), три гидрофобных фенилаланина (f), заряженный положительно аргинин (r) и заряженный отрицательно (s) серин. Аминокислотная последовательность ColQ и Prima соответствующая контакту с WAP областью АСhЕ:

60 pppppppppp Prima
61 lfpppff r g s ColQ

Сравнение аминокислотной последовательности показывает, что ColQ в области контакта с АСhЕ имеет дополнительную (по сравнению с Prima) возможность присоединения какого-либо соединения к зарядам «гуанидиновой вилки» аргинина (r) и отрицательного серина (s), находящихся в гидрофобной области, образованной 3 фенилаланинами (f) [9]. Соседняя область, граничащая с контактом с WAP АСhЕ, также несколько отличается:

50 icqcrppppl Prima
51 ccllmppppr ColQ

Выделенный 59 остаток циклического (р) пролина крайне важен для образования АСhЕ комплексов с Prima и ColQ: показано, что аминокислотная замена этого остатка приводит к разрушению гетероолигомеров А12 и G4 [10].

С целью обнаружения возможных кинетических различий связанных со структурным различием в коллагеновой части АСhЕ из двигательной мышцы EDL и АСhЕ из мозга крысы, было исследовано влияние на реакцию в экстрактах неспецифического ингибитора прозерина (неостигмин). На рис. 3 показан график зависимости начальной скорости реакции, определенной на квазистационарном линейном участке кривой A(t) в зависимости от концентрации субстрата ацетилтиохолина в условиях ингибирования прозеринном. Определенная нами в координатах Лайнуивера-Берка константа ингибирования ацетилхолинэстеразы из EDL по порядку величины совпадает с полученным ранее в электрофизиологии значением [6] и составляет $K_i^{(прозерин)} = 0,4 \cdot 10^{-5}$ М.

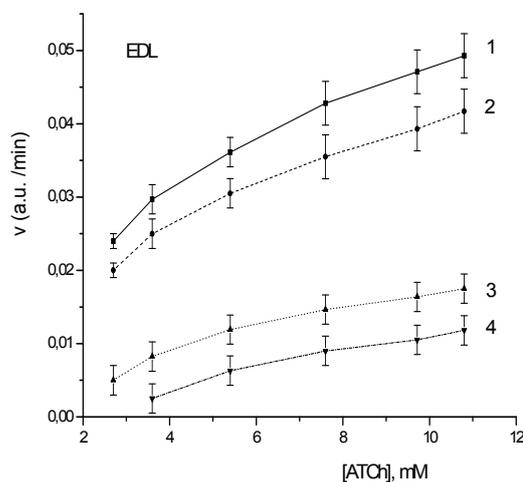


Рис. 3 – Зависимость начальной скорости реакции, катализируемой эстеразой из экстракта EDL крысы от концентрации субстрата ацетилтиохолина: 1) кинетическая кривая реакции в К-фосфатном буфере, pH 8.0; 36° С, без ингибиторов; 2) реакция в тех же условиях в присутствии $2 \cdot 10^{-5}$ М iso-OMPA; 3) $2 \cdot 10^{-5}$ М iso-OMPA и 10^{-5} М прозерина; 4) $2 \cdot 10^{-5}$ М iso-OMPA и $5 \cdot 10^{-5}$ М прозерина

На следующем графике (рис. 4) показана зависимость начальной скорости реакции, катализи-

руемой АСhE мозга крысы в клеточном экстракте от концентрации субстрата ацетилтихолина при различных концентрациях ингибитора прозерина.

Для мозга экспериментально найденная константа ингибирования прозеринот АСhE практически совпадает с аналогичной константой для двигательной мышцы EDL, и составляет $K_i(\text{прозерин}) = 0,43 \cdot 10^{-5} \text{ М}$. Полученные кинетические данные показывают неспецифичность действия прозерина на АСhE из локомоторной мышцы EDL и головного мозга крысы.

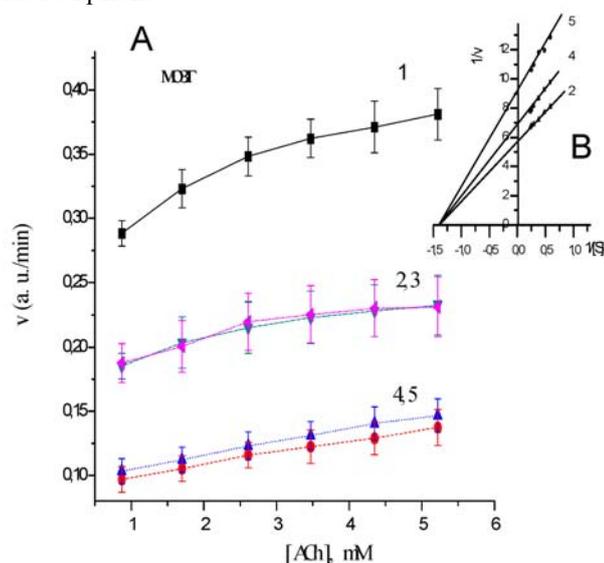


Рис. 4 – Зависимость начальной скорости реакции, катализируемой эстеразами мозга крысы от концентрации субстрата ацетилтихолина при различных концентрациях ингибиторов: 1) без ингибиторов; 2) $2 \cdot 10^{-5} \text{ М iso-OMPA}$; 3) $0,3 \cdot 10^{-7} \text{ М прозерин}$, $2 \cdot 10^{-5} \text{ М iso-OMPA}$; 4) $0,5 \cdot 10^{-4} \text{ М прозерин}$, $2 \cdot 10^{-5} \text{ М iso-OMPA}$; 5) $0,3 \cdot 10^{-4} \text{ М прозерин}$, $2 \cdot 10^{-5} \text{ М iso-OMPA}$; $0,05 \text{ М К-фосфат}$, $\text{pH } 8,0$; 36° C

Автор благодарит К.А. Петрова (ИОФХ РАН им. А.Е.Арбузова, Казань) за предоставление образцов и участие в постановке задачи и Э.А. Бухараеву (КГМУ, Казань) за участие в обсуждении результатов.

Литература

1. G.L. Ellman, K.D. Courtney, V.J. Andres. *Biochem. Pharmacol.*, **7**, 88-95 (1961)
2. С.А. Понкратова, В.М. Емельянов, А.С. Сироткин, М.В. Шулаев. *Вестник Казанского технол. ун-та*, **6**, 76-85 (2010)
3. И.А. Храмова, М.В. Шулаев. *Вестник Казанского технол. ун-та*, **1**, 159-165 (2010)
4. R.J. Richardson. In: *Comprehensive Toxicology*, (McQueen C.A. Ed.) // Oxford: Academic Press, **13**, 433-444 (2010).
5. Y. Ashani, Z. Radić, I. Tsigelny, D.C. Vellom, N.A. Pickering, D.M. Quinn, V.P. Doctor, P. Taylor. *J Biol Chem.*, **270**, 11, 6370-80 (1995)
6. M.M. Bradford. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-54 (1976)
7. И. В. Ковязина, К. А. Петров, Л. О. Ягодина, Э. А. Бухараева, В. В. Зобов, В. С. Резник. *Химия и медицина*, (Уфа, Россия, 26-29 ноября, 2007) Тезисы докладов VI Всероссийского научного семинара. Уфа, 2007. С.56
8. Д.В. Абрамочкин, К.А. Петров, В.В. Зобов, Л.О. Ягодина Л.О., Е.Е. Никольский, Л.В. Розенштраух. *Кардиология*, **49**, 1, 47-50 (2009)
9. C. Donger., E. Krejci, A.P. Serradell, B. Eymard, S. Bon, S. Nicole, D. Chateau, F. Gary, M. Fardeau, J. Massoulié, P. Guicheney. *Am. J. Hum. Genet.*, **63**, 967-975 (1998)
10. H. Dvir, M. Harel, S. Bon, W.Q. Lio, M. Vidal, C. Garbay, J.L. Sussman, J. Massoulié, I. Silman. *EMBO J.*, **23**, 4394-4405 (2004)
11. J. Massoulié, A. Anselmet, S. Bon, E. Krejci, C. Legay, N. Morel, S. Simon. *Chem Biol Interact.*, **119-120**, 29-42 (1999)
12. A. Dobbertin, A. Hrabovska, K. Dembele, S. Camp, P. Taylor, E. Krejci, V. Bernard. *J Neurosci*, **29**, 4519-30 (2009)

© Л.О. Ягодина – канд. биол. наук, доц. каф. химической кибернетики КНИТУ, floral2010@mail.ru.

Все статьи номера поступили в редакцию журнала в период с 15.11.12. по 30.11.12.