



ПИСЬМА РЕДАКТОРУ

УДК 557.153.4.04

ИЗОФОРМЫ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ НА ОСНОВЕ РАЗЛИЧНОЙ СТЕПЕНИ ДЕЗАМИДИРОВАНИЯ ПОЛИПЕПТИДНОЙ ЦЕПИ

Раба Р. Э., Аавиксаар А. А.

Институт химической и биологической физики Академии наук ЭССР, Таллин

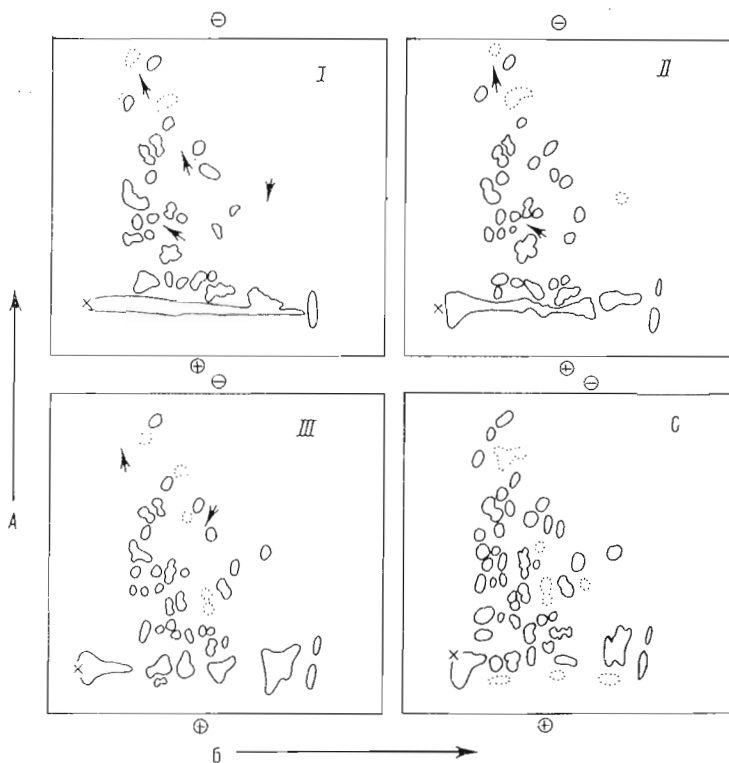
Применение метода аффинной хроматографии при очистке ацетилхолинэстеразы (КФ 3.1.1.7) яда элапидных змей позволило в последние годы подробно изучить молекулярные свойства этого фермента [1–4], который по специфичности действия совпадает с ацетилхолинэстеразами эритроцитов и нервной ткани млекопитающих [5]. В отличие от ацетилхолинэстеразы из тканей фермент яда змей не имеет молекулярных форм, различающихся по размерам и симметрии молекулы. При электрофокусировании и диск-электрофорезе цельного яда или чистой ацетилхолинэстеразы она, однако, разделяется на большое число (до 16) активных фракций, которые в литературе рассматриваются как ее изоферменты [2–4, 6].

Настоящее исследование посвящено выяснению причин существования изоформ.

Препаративным изоэлектрофокусированием в слое сефадекса G-75 (2% амфолина, рН 5–8; «Multifor» — ЛКВ, Швеция) ацетилхолинэстераза яда среднеазиатской кобры *Naja naja oxiana* (10 мг препарата после аффинной хроматографии [4]) была разделена на 5 фракций, расположенных в интервале рН от 5,0 до 6,2. Основная часть ацетилхолинэстеразной активности была локализована в трех фракциях с изоэлектрическими точками 5–9–6,2; 5,6–5,9 и 5,4–5,6, которые были использованы для дальнейшего анализа (фракции I–III соответственно).

Аминокислотный состав (кислотный гидролиз в 6 н. HCl, 110° С, время 24 ч, анализатор ААА 88, Чехословакия) изоформ фермента в отдельных фракциях оказался одинаковым и был весьма сходен с аминокислотным составом ацетилхолинэстераз из ядов других элапидных змей [2, 3]. В качестве N-концевого остатка в препарате из яда среднеазиатской кобры был идентифицирован серин (дансильный метод по Грею [7]). Ранее было показано, что молекула этого фермента состоит из одной полипептидной цепи [4].

Анализ пептидных карт триптических гидролизатов фракций I–III (рисунок) выявил небольшое число (2–3) несопоставимых пятен на пептидных картах сравниваемых фракций, что указывает на неидентичность некоторых пептидных фрагментов. Расположение основной части пятен (35–40), однако, было одинаковым для всех фракций. Число пятен на карте смеси изоформ при этом не превышало значительно числа пятен на картах отдельных фракций (около 50, в соответствии с числом остатков аргинина и лизина в молекуле белка), что указывает на отсутствие в ацетилхолинэстеразе яда кобры изоферментов с существенными различиями в аминокислотной последовательности. Учитывая также постоянство аминокислотного состава отдельных фракций, мы предполагали, что причиной образования изоформ могло бы быть посттрансляционное модифицирование боковых групп аминокислотных остатков в полипептидной цепи АХЭ.



Пептидные карты триптических гидролизатов ацетилхолинэстеразы из яда кобры (С) и ее фракций, полученных изоэлектрическим фокусированием (I—III). Пластинки силикагеля 200×200×0,25 мм, электрофорез (А) и хроматография (В) по Грейси [13]. х — место нанесения пробы. Пунктиром обозначены пятна, интенсивность которых находится на нижнем пределе определения. Отсутствующие пятна во фракциях I—III обозначены стрелками

Из возможных модификаций были рассмотрены фосфорилирование, дезамидирование и блокирование первичных аминогрупп.

Первая отпадала, потому что ацетилхолинэстераза не содержала фосфатных групп (по определению микрометодом Бартлетта [8]). Титрование первичных аминогрупп флуорескамином [9] при флуориметрическом контроле (отн. флуоресценция, %) дало совпадающие результаты для трех фракций: соответственно 0,945; 0,948 и 0,957 %/мкг.

Значительные различия, однако, были найдены в количестве свободных карбоксильных групп. Карбоксильные группы были определены по связыванию с ними метилового эфира [^{14}C]глицина с помощью водорастворимого карбодимида (рН 4,75; 0,1 М N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодимид, 0,1 М O-метил- ^{14}C глицин, 0,4 мКи/г, время связывания 24 ч). Их число в расчете на 1 моль белка (M 67 000 [4]) для фракций I—III соответственно равнялось 41,8; 42,7 и 46,6. Максимальная разница в количестве свободных карбоксильных групп по фракциям составляла около 5 групп. Так как обработка ацетилхолинэстеразы нейраминидазой для отщепления сиаловой кислоты не уменьшает числа изоформ [4], мы сделали вывод, что источником гетерогенности фермента является дезамидирование глутамина и/или аспарагина в ее молекуле.

Робинзоном и др. [10] показано, что глутаминовые и аспарагиновые остатки в полипептидах весьма склонны к спонтанному дезамидированию. Скорость дезамидирования при этом сильно зависит от структуры пептида. Недавно было установлено, что спонтанное дезамидирование проходит также в белках, в γ -глобулине, альбумине, РНКазе [11]. Высказана также гипотеза, что дезамидирование может иногда идти ферментативным путем [12].

Возможно, что реакция дезамидирования является одной из наиболее

распространенных причин электрофоретической гетерогенности белков. В зависимости от расположения возникающих свободных карбоксильных групп в полипептидной цепи их вклад в общий заряд (в pI) белка должен быть неодинаковым, что приводит к образованию большого числа изоформ при наличии небольшого числа новых карбоксильных групп, полученных в результате дезамидирования. Именно такая картина наблюдалась в случае ацетилхолинэстеразы яда кобры. Количество изоформ, по данным электрофокусирования, при этом уменьшалось по мере увеличения ее кислотности, что согласуется с предположением о дезамидировании белка.

ЛИТЕРАТУРА

1. Kumar V., Elliott W. B. Eur. J. Biochem., 1973, v. 34, № 3, p. 586–592.
2. Grossmann H., Liefländer M. J. Chromatogr., 1979, v. 177, № 1, p. 99–107.
3. Grossmann H., Weinert M., Liefländer M. Z. Naturforsch. Ser. C., 1979, Bd. 34, № 1–2, S. 27–32.
4. Raba R., Aaviksaar A., Raba M., Sügur J. Eur. J. Biochem., 1979, v. 96, № 1, p. 151–158.
5. Kesvatera T., Ustav M., Aaviksaar A. Compar. Biochem. and Physiol., 1979, v. 62C, № 2, p. 193–197.
6. Lee S.-R., Latta J. L., Elliott W. B. Compar. Biochem. and Physiol., 1977, v. 56C, № 2, p. 193–197.
7. Gray W. R. Meth. Enzymol., 1972, v. 25B, p. 121–138.
8. Bartlett G. R. J. Biol. Chem., 1959, v. 234, № 3, p. 466–468.
9. Böhlen P., Stein S., Pairman W., Udenfriend S. Arch. Biochem. and Biophys., 1973, v. 155, № 1, p. 213–220.
10. Robinson A. B., Scotchler J. W., McKerrow J. H. J. Amer. Chem. Soc., 1973, v. 96, № 24, p. 8156–8159.
11. Кричевская А. А., Лукаш А. И., Пушкина Н. В. Изв. Сев.-Кавк. научн. центра высш. школ. Естеств. науки, 1980, № 3, с. 90–94.
12. Myces M. J., Waelsch H. J. Biol. Chem., 1960, v. 235, № 12, p. 3513–3517.
13. Gracy R. W. Meth. Enzymol., 1977, v. 47E, p. 195–204.

Поступило в редакцию
25.XI.1981

ACETYLCHOLINESTERASE ISOFORMS WITH DIFFERENT LEVEL OF POLYPEPTIDE CHAIN DEAMIDATION

RABA R. E., AAVIKSAAR A. A.

*Institute of Chemical Physics and Biophysics, Academy
of Sciences of the Estonian SSR, Tallinn*

Isoforms of cobra venom (*Naja naja oxiana*) acetylcholinesterase (EC 3.1.1.7) were separated by preparative isoelectric focusing. Three major fractions had identical amino acid compositions and similar tryptic peptide maps. Determination of charged groups revealed that the isoforms differed only by the number of free carboxyl groups in the enzyme molecule. The conclusion that the acetylcholinesterase isoforms are the result of spontaneous deamidation of asparagine and/or glutamine side chains has been made.