

В. С. РЕПИН, В. Н. РОСТОВЦЕВ

**ВЫДЕЛЕНИЕ ВЫСОКОПОЛИМЕРНОЙ
ДИГИДРОФОЛАТРЕДУКТАЗЫ ИЗ ЭМБРИОНОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ
МЕТОДОМ ГЕЛЬ-ФИЛЬТРАЦИИ НА КОЛОНКЕ СЕФАРОЗА 4В**

(Представлено академиком В. Н. Черниговским 2 VI 1970)

Дигидрофолатредуктаза (ДГФР) (КФ 1.5.1.3; 5, 6, 7, 8-тетрагидрофолат: НАДФ-оксиредуктаза) является важнейшим энзимом-регулятором фолатного цикла клетки (¹). Особый интерес вызывают функции этого энзима на разных стадиях эмбриогенеза млекопитающих, поскольку в эмбриональных клетках фолатный цикл выполняет роль приводного механизма дифференцировки, обеспечивая потребность клеток в нуклеотидах, сопряжение ауторедупликации и транскрипции ДНК, регуляцию формильного пула инициаторных тРНК, биосинтез липидов, некоторых гормонов и медиаторов (^{2, 3}). Биохимические функции, кинетические характеристики и молекулярная структура ДГФР дифференцированных клеток уже весьма подробно описаны. Известно, что во взрослом организме млекопитающих основная часть энзима локализована в печени (пДГФР). Для всех изученных видов млекопитающих пДГФР представлена энзимом — полипептидной цепью с молекулярным весом порядка 21 000—24 000 (⁴). Представляет интерес выяснить, каким образом осуществляется синтез коэнзимных форм фолевой кислоты (ФК) у эмбрионов млекопитающих до закладки печени и на тех стадиях, когда этот орган выполняет преимущественно кроветворные функции (11—13 день развития эмбрионов крыс) (⁵).

Работа выполнена на эмбрионах нелинейных белых крыс весом 230—250 г. Первым днем беременности считали день обнаружения спермиев в вагинальных мазках у самок, подсаженных накануне вечером на стадиях проэструс — эструс к самцам. Животных убивали на заданном сроке беременности, плоды извлекали из матки, отделяли от плодных оболочек, взвешивали и гомогенизировали в тефлоновом гомогенизаторе в 0,25 М сахарозе — 0,05 М трис рН 7,4 (соотношение вес ткани: объем сахарозы 1:4). Для приготовления гомогената в количестве, достаточном для дальнейшего фракционирования, забивали 20—35 беременных крыс 11 или 12 дня беременности, и для извлечения энзима брали 180—250 живых эмбрионов. Все операции производили на холоду. Ядра, митохондрии и микросомы отделяли обычным способом дифференциального скоростного центрифугирования. Постмикросомальную растворимую фракцию (РФ) эмбриональных клеток, полученную центрифугированием 90 мин. при 45 000 g, в объеме 2 мл. наносили на колонку Сефароза 4В размером 2,0×50 см. Эта колонка была предварительно откалибрована при помощи «маркерных» полимеров (рис. 1). Все операции с сефарозой: отмучивание, уравнивание, наполнение колонки — были выполнены в соответствии с рекомендациями фирмы «Pharmacia» (⁶). Перед опытом колонка была уравновешена 0,15 М трис — 0,02 меркаптоэтанолом (МЭ) рН 7,4. Элюцию вели тем же буфером фракциями по 3 мл на автоматическом коллекторе. Объемы раскопанных проб повторно измерялись. Скорость элюции составляла 5 мл/час·см². Расчет коэффициента распределения K_{av} биополимеров

как функция молекулярного веса производили по формуле:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0},$$

где V_e — объем элюции данного вещества; V_t — объем рабочего столба сефарозы (в нашем случае 157 мл); V_0 — свободный объем колонки, измеренный при помощи высокополимерной фракции голубого декстрана 2000

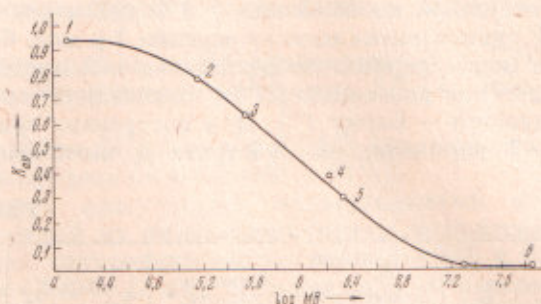


Рис. 1. Определение молекулярного веса виДГФР эмбрионов методом гели-фильтрации на колонке Сефароза 4В по Эндриусу (5). 1 — цитохром С, 2 — церулоплазмин, 3 — виДГФР, 4 — фак F₂, 5 — декстран голубой, 6 — фак λ.

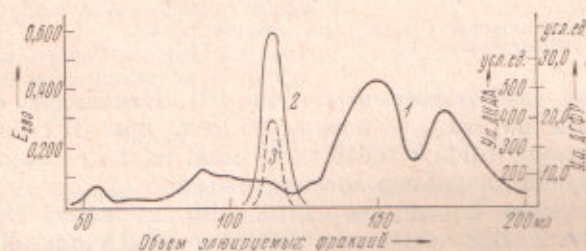


Рис. 2. Хроматограмма РФ эмбрионов крыс 11 дня развития на колонке Сефароза 4В. 1 — E_{280} , 2 — специфическая удельная активность ДГФР, 3 — то же ДЦДА

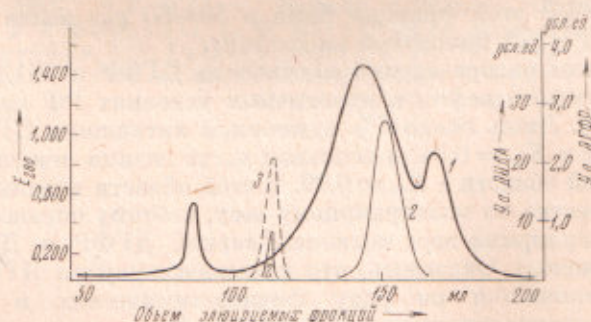


Рис. 3. Гель-фильтрация РФ гомогената печени взрослой крысы через колонку Сефарозы 4В. Условия опыта и обозначения те же, что на рис. 2

(«Serva Entwicklung», Швейцария). В нашем опыте $V_0 = 44$ мл. Объем элюции вещества определяли с момента всасывания половины объема пробы (2 мл) до середины фракции, имеющей максимальное специфическое поглощение для элюируемого соединения. В каждой фракции измеряли оптическую плотность при 260 и 280 мμ и активность ДГФР и дезо-

ксидитидилатдезаминазы (ДЦДА). Активность ДГФР определяли по методу (7). Дигидрофолиевую кислоту (ФК-Н₂) получали восстановлением ФК («Calbiochem») дитионитом в присутствии аскорбата (8). Препараты ФК-Н₂ имели $E_{280/240} = 3,0$, что соответствует 100% восстановлению ФК. Начальную скорость энзиматической реакции определяли по ΔE_{310} за первые 15 сек. после запуска реакции ФК-Н₂ на спектрофотометре СФ-4А с электронным потенциометром ЭПП-17МЗ в качестве регистрирующего устройства. Специфичность окисления НАДФ-Н₂ в системе контролировали 10⁻⁵ М амипоптеринном, вызывающим 100% остановку реакции. 1 ед. активности ДГФР эквивалентна восстановлению 1 μ мол. ФК-Н₂ за 1 мин., рассчитанному из молекулярного коэффициента экстинкции 12 300 мол⁻¹ · см⁻¹ (9). Кинетические константы ДГФР определяли методом обратных величин по Лайнуиверу — Берку (10). Для построения графика использовали не менее 4—5 концентраций субстрата и ингибитора. Активность

Таблица 1

Энзим	Молекул. вес ($\pm 10\%$)	Оптимум pH	Термоста- бильность, %	K_m ФК-Н ₂ , М	K_i Пир, М **
впДГФР	27 · 10 ⁴	6,6	} <20 67	1,7 · 10 ⁻⁸	4,8 · 10 ⁻¹⁰
пДГФР	21 · 10 ³	7,2		1,6 · 10 ⁻⁷	1,4 · 10 ⁻⁸
		6,5			

* Остаточная активность после 3 мин. нагрева при 50°.

** Пир — пириметамин.

ДЦДА измеряли спектрофотометрически (11). Начальную скорость реакции высчитывали по ΔE_{290} за первые 10 мин. при 37°. 1 ед. активности ДЦДА соответствует $\Delta E_{290} = 0,010$ за 10 мин. на 1 мг белка. Концентрацию белка измеряли микробиуретовым методом.

Типичная картина фракционирования РФ эмбрионов 11 дня развития показана на рис. 2. Вся активность ДГФР и ДЦДА оказалась сосредоточенной в зоне, соответствующей объему элюции 110—119,3 мл. Максимальная активность обоих энзимов была обнаружена в пробе 116,5 $\pm$ 1,5 мл ($K_{av} = 0,64 \pm 0,02$). Молекулярный вес этой зоны, рассчитанный из калибровочной кривой (см. рис. 1), соответствует 270 000 $\pm$ 10%. Удельная активность ДГФР этой фракции была в 50—80 раз выше удельной активности ДГФР в РФ, наносимой на колонку.

Иная картина распределения активности ДГФР и ДЦДА была обнаружена при хроматографии в идентичных условиях РФ печени взрослой крысы (рис. 3). Лишь около 5% суммарной активности ДГФР удавалось выявить в зоне с $K_{av} = 0,64$, а основная часть энзима локализована в низкомолекулярной области с $K_{av} = 0,99$. В этой области колонка сефарозы не разделяет вещества по молекулярному весу, поэтому определить достаточно точно молекулярные веса низкополимерной ДГФР и ДЦДА из этих данных невозможно. Оказалось, что высокополимерная ДГФР эмбрионов (впДГФР) отличается по ряду физико-химических и кинетических свойств от низкомолекулярной пДГФР (табл. 1).

Особенно интересен тот факт, что эмбриональная впДГФР имеет на порядок более высокое сродство к специфическому ингибитору — 2,4-диамино, 5-хлорфенил, 6-этилпиримидину (пириметамину). Любопытно, что впДГФР до сих пор была обнаружена лишь в клетках простейших, обладающих необычайно высокой чувствительностью к пириметамину. Это некоторые виды малярийного плазмодия и большая группа трипаносомид (12, 13). На принципе селективной чувствительности впДГФР простейших к производным 2,4-диаминопиримидина построена стратегия химиотерапии этих паразитарных заболеваний.

По аналогии мы предположили, что обнаруженная недавно высокая чувствительность эмбриональных клеток млекопитающих к пириметамину и его аналогам, выражающаяся в гибели и уродствах эмбрионов на определенных стадиях развития (¹⁴), имеет в основе сходный молекулярный механизм. В настоящее время мы получили прямые экспериментальные доказательства в пользу того, что явления селективного действия пириметаминна на эмбриогенез млекопитающих объясняются, в первую очередь, наличием в плодах вДГФР, обладающей повышенным сродством к аналогам 2,4-диаминопиримидина по сравнению с пДГФР клеток материнского организма.

Во всех наших опытах по фракционированию вДГФР в той же зоне мы обязательно обнаруживали активность ДЦДА. Этот факт можно объяснить двояко:

1. Эмбриональная ДЦДА как и ДГФР представлена полимером сходного молекулярного веса (т. е. $270\,000 \pm 10\%$).

2. В эмбрионах присутствует мультиэнзимный комплекс ДГФР — ДЦДА, составленный из низкомолекулярных мономеров. Этот мультиэнзим осуществляет синхронный синтез дезокси-УМФ и ФК-Н₂ из дигидрофолата и дезокси-УМФ. В этих условиях вДГФР в основном используется для биосинтеза ДНК. Структурное «разобщение» птерозинимов и биосинтеза ДНК на уровне тимидилатсинтетазы в эмбрионах наступает после начала синтеза водорастворимой низкомолекулярной ДГФР печени. С этого момента устанавливаются новые контрольные механизмы сопряжения биосинтеза ДНК с работой фолатного цикла, свойственные дифференцированным типам клеток млекопитающих.

Институт экспериментальной медицины
Академии медицинских наук СССР
Ленинград

Поступило
21 V 1970.

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Adv. Enzyme Regulat. (Ed. G. Weber), 6, 305 (1968). ² E. L. R. Stokstad, J. Koch, Physiol. Rev., 47, 83 (1967). ³ P. Lengyel, D. Söll, Bacteriol. Rev., 33, 265 (1969). ⁴ F. Keibel, In: Normentafeln zur Entwicklungsgeschichte der Wirbeltiere (Wanderratte), H. 15, 78 (1937). ⁵ P. Andrews, Biochem. J., 91, 222 (1964).
- ⁶ Gel Filtration in Theory and Practice, Pharmacia, Upsalla, 1968. ⁷ C. K. Mathews, K. G. Scrimgeour, F. M. Huennekens, Methods in Enzymol., 6, 364 (1963).
- ⁸ S. Futterman, J. Biol. Chem., 228, 1031 (1957). ⁹ B. L. Hillcoat, P. F. Nixon, R. L. Blakeley, Anal. Biochem., 21, 178 (1967). ¹⁰ М. Диксон, Э. Уэбб, Ферменты, ИЛ, 1961. ¹¹ F. Maley, Methods in Enzymol., 12, Part A, 170 (1967).
- ¹² R. Ferone, J. J. Burchall, G. H. Hitchings, Molec. Pharm., 5, 49 (1969).
- ¹³ W. E. Gutteridge, J. J. Jaffe, J. J. McCormack, Biochim. et biophys. acta, 191, 753 (1969). ¹⁴ А. П. Дыбан, И. М. Акимова, В. Н. Светлова, ДАН, 163, 1514 (1965).