

Biochemiczne właściwości cholinesterazy tasiemca *Hymenolepis diminuta*

Agnieszka Świetlikowska

Praca doktorska wykonana w Zakładzie Biologii Molekularnej (Pracownia Biochemii) Instytutu Parazytologii P. A. N. im. W. Stefańskiego w Warszawie, obroniona 24 lutego 2004 r.

Promotor:

Doc. dr hab. Tadeusz Moczoń

Recenzenci:

Prof. dr hab. Danuta Maślińska

Prof. dr hab. Halina Wędrychowicz

Streszczenie

Wyróżnia się dwa zasadnicze typy cholinesteraz występujących w tkankach zwierząt wielokomórkowych: acetylocholinesterazy (AChE) i butyrylocholinesterazy (BChE). Różnią się one powinowactwem do naturalnych i syntetycznych substratów oraz wrażliwością na pewne inhibitory. AChE i BChE kręgowców są monomerami lub oligomerami podjednostek katalitycznych o charakterze glikoprotein. Występują one w wielu formach molekularnych różniących się składem podjednostek i właściwościami hydrodynamicznymi. Na podstawie różnic w strukturze czwartorzędowej cholinesterazy wygodnie dzieli się na dwie grupy: ChE globularne (G) i ChE asymetryczne (A). W grupie G wyróżnia się formy monomeryczne i oligomeryczne, a wśród nich formy nieamfifilowe („rozpuszczalne”) oraz amfifilowe (zawierające kotwiczące domeny hydrofobowe końca C lub kotwiczące podjednostki niekatalityczne, które w warunkach niedenaturujących wiążą detergenty niejonowe). Cholinesterazy grupy A są oligomerycznymi formami nieamfifilowymi, gdyż ich kotwice kolagenopodobne nie wiążą detergentów niejonowych.

Do badań wybrano tasiemca *Hymenolepis diminuta* i postanowiono zbadać cholinesterazy jego stadiów rozwojowych, a więc onkosfer, cysticerkoidów i dojrzałych płciowo tasiemców, tak by dać odpowiedź na kilka podstawowych pytań, które nasunęły się podczas studiowania literatury o cholinesterazach różnych zwierząt: Czy wymieniana w piśmiennictwie AChE i „pseudocholinestaza” (tj. BChE), których obecność została stwierdzona w tkankach dojrzałych płciowo osobników *Hymenolepis diminuta*, są dwoma różnymi enzymami, czy jest to jeden rodzaj enzymu – AChE o właściwościach pośrednich między AChE a BChE, i jakie są jej cechy charakterystyczne – specyficzność substratowa, hamowanie przez nadmiar substratu, względna masa cząsteczkowa, punkt izoelektryczny, stała sedymentacji, wła-

ściwości amfifilowe lub nieamfifilowe, aktywacja przez kationy metali jednowartościowych i dwu-wartościowych, wrażliwość na specyficzne i niespecyficzne inhibitory acetylo- i butyrylo-cholinesteraz, wrażliwość na działanie detergentów niejonowych, kationowych, anionowych i zwitterjonowych oraz podatność na solubilizację nimi, rodzaj kotwicy mocującej enzym w błonach komórkowych, ewentualnie brak struktury kotwiczącej?

Czy w ciele onkosfer występuje cholinesteraza nieneuralna oraz czy w trakcie rozwoju onkosfery w stadium cysticerkoida zachodzi ekspresja neuralnej AchE, a także czy w rozwoju larwy ma również miejsce ekspresja cholinesterazy nieneuralnej?

Czy cholinesteraza dorosłego tasiemca i jego stadiów larwalnych jest enzymem monomorficznym czy polimorficznym?

Czy cholinesterazy tasiemca, nieodwracalnie zinaktywowane inhibitorem fosforoorganicznym (diizopropylofluorofosforanem) są podatne na reaktywację oksymami (PAM-2, TMB-4) podobnie jak cholinesterazy zwierząt kręgowych?

Czy cholinesterazy *H. diminuta* są glikoproteinami i jakiego typu łańcuchy oligosacharydowe występują w cząsteczce cholinesterazy tasiemca?

Stosując metody elektroforezy w żelu poliakrylamidowym w warunkach niedenaturujących w obecności i nieobecności detergentu Tritonu X-100 oraz elektroforezy metodą SDS-PAGE w nieciągłym układzie buforującym wg Laemmli, spektrofotometryczną z wykorzystaniem DTNB, western blottingu oraz metod histochemicznych z zastosowaniem specyficznych substratów i inhibitorów ustalono, że w organizmie tasiemca *Hymenolepis diminuta* występuje amfifilowa, globularna forma AchE – T (G_1^a)⁻ o M_r 66 kDa i pI 5,1, zakotwiczona końcem C w peryferyjnej warstwie błony komórek. Enzym ten jest „prawdziwą” AchE, wrażliwą na działanie BW 284C51 i niewrażliwą na działanie izo-OMPA, a BchE przypomina jedynie znaczną odpornością na hamujące działanie ambenonium i edrofonium. Jest odporny na denaturujące działanie SDS i CTAB, nie ulega inaktywacji pod wpływem detergentów niejonowych i zwitterjonowych. Nie inaktywują go także związki modyfikujące grupy sulfhydrylowe. Jony metali (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} i Mn^{2+}) nie wywierają nań wpływu aktywującego. AchE z *H. diminuta* jest enzymem monomorficznym. W warunkach elektroforezy natywnej ruchliwość enzymu z dorosłych tasiemców, z onkosfer i cysticerkoidów, jest identyczna. Jest ona identyczna także w warunkach SDS-PAGE, co wskazuje na stadialną, genetyczną ciągłość enzymu. Niespecyficzne esterazy wyekstrahowane ze wszystkich trzech stadiów rozwojowych tasiemca nie hydrolizują estrów tiocholiny. Aktywność badanej AchE wobec acetylotiocholiny jest 2,6 razy wyższa niż wobec propionyltiocholiny, 6,9 razy wyższa niż wobec butyrylotiocholiny i 26 razy wyższa niż wobec *N*-acetylo- β -metylotiocholiny. W środowisku o pH 7,2, zawierającym 3 mM acetylotiocholiny, nie zachodzi hamowanie aktywności AchE przez nadmiar substratu, natomiast przy pH 8,0 obserwuje się hamowanie aktywności przy stężeniu substratu wyższym niż 1,6

mM. Te dane oraz wrażliwość AchE na 10^{-5} M BW244C51 i niewrażliwość na 10^{-4} M izo-OMPA dowodzą, że zbadany enzym nie jest BchE. Enzym ulega inaktywacji przez 10^{-6} M diizopropylofluorofosforan. W warunkach histochemicznych inaktywacja ta jest częściowo odwracalna pod wpływem działania oksymów (PAM-2 i TMB-4) zaaplikowanych tuż po utracie aktywności przez enzym. Zahamowana AchE ulega powolnemu procesowi „starzenia się” – po 48 godzinach odzyskanie jej aktywności przy pomocy oksymów jest bezowocne. AchE z tasiemca jest glikoproteiną. W jej polipeptydowy rdzeń wbudowane są nieliczne łańcuchy *N*-oligoglikanowe najprawdopodobniej typu kompleksowego, a także nieliczne łańcuchy *O*-oligoglikanowe.

W miocytach haków onkosfer oraz prawdopodobnie w miocytach zwieraczy kanałów gruczołu penetracyjnego tych larw występuje AchE nieneuralna. W ciele onkosfer nie wykryto neuralnej AchE. Ekspresja neuralnej AchE w rozwijających się cysticerkoidach zachodzi ok. 6-7 dnia po zarażeniu chrząszczy *Tenebrio molitor* onkosferami tasiemca. Wcześniej, ok. 4 dnia po zarażeniu, w subtegumentalnych mięśniach okrężnych larwy pojawia się aktywność nieneuralnej AchE. Kilka dni później ma miejsce ekspresja nieneuralnej AchE w komórkach tworzących wyściółkę jamy cysty. Wyściółka ta stanowi fizjologiczną barierę zapobiegającą przedostawaniu się endogennych i egzogennych estrów choliny do inwaginowanego skoleksa. AchE onkosfer i cysticerkoidów hydrolizuje butyrylotiocholiny wolniej niż acetylotiocholiny, najwolniej zaś hydrolizuje *N*-acetylo- β -metylotiocholiny. Cechuje ją taka sama wrażliwość na inhibitory cholinesteraz jaka cechuje enzym z dojrzałych płciowo tasiemców.