

78. G. TOSCHI. — Ricerche cromatografiche ed elettroforetiche sulla colinesterasi del tessuto nervoso. (*)

Riassunto. — Diverse preparazioni « solubilizzate » di colinesterasi del tessuto nervoso sono state ottenute partendo da strutture subcellulari (mitocondri e microsomi) del cervello di ratto, coniglio e vitello.

Queste preparazioni sono state frazionate mediante cromatografia di adsorbimento e a scambio ionico e mediante elettroforesi su colonna. Si sono aggiunte alcune osservazioni all'ultracentrifuga analitica.

Le preparazioni studiate appaiono costituite da micelle lipoproteiche, distribuite in un'ampia serie, con dimensioni variabili, probabilmente dell'ordine di grandezza delle lipoproteine sieriche. La elettroforesi su colonna delle preparazioni solubilizzate con tensioattivi non ionici ha permesso la separazione di diversi componenti elettroforetici distinti. La colinesterasi si ritrova selettivamente concentrata in un componente caratterizzato da bassa mobilità. Questo costituisce una preparazione purificata di colinesterasi, ben definita per l'origine citologica e i caratteri fisico-chimici e avente caratteristiche enzimatiche corrispondenti a quelle della colinesterasi « vera ».

Résumé. — Des préparations solubilisées de cholinesterase du tissu nerveux ont été obtenues, en partant de fractions subcellulaires (mitochondries et microsomes) du cerveau de rat, de lapin et de veau. Ces préparations ont été fractionnées par chromatographie d'adsorption et d'échange, aussi que par électrophorèse sur colonne de cellulose. Elles ont été aussi examinées par la centrifuge analytique. Les préparations étudiés sont formées de micelles lipoprotéiniques, avec des dimensions du même rang que les lipoprotéines du serum. Par l'électrophorèse sur colonne des préparations solubilisés avec des tensioactifs non ioniques on a obtenu la séparation de plusieurs constituants. La cholinesterase se retrouve dans un constituant doué de mobilité réduite. Celui ci représente une préparation purifiée de cholinestérase ayant une origine cytologique bien définie et des propriétés enzymatiques qui correspondent à celles de la « vraie » cholinesterase.

(*) Il presente lavoro fa parte di un programma di ricerche sulla colinesterasi del cervello, svolto in parte presso l'Istituto di Biochimica della Università di Upsala (Svezia), con borsa di studio del C.N.R. Desidero ringraziare il Prof. A. TISELIUS e i suoi collaboratori per la generosa ospitalità, per i preziosi insegnamenti e per i mezzi messi gentilmente a mia disposizione.

Summary. — Various solubilised preparations of cholinesterase of nervous tissue were obtained from subcellular structures (mitochondria and microsomes) prepared from rat, rabbit and calf brain. These preparations were fractionated by adsorption and ion-exchange chromatography and by column electrophoresis. Examinations with the analytical ultracentrifuge were also performed. The preparations studied appear to consist of lipoprotein micelles distributed over a wide range of dimensions, similar to that of serum lipoproteins. Column electrophoresis of preparations solubilised by non ionic surface-active agents allows the separation of various components. The cholinesterase is selectively concentrated in a component characterized by a low mobility. This component represents a purified preparation of cholinesterase of well defined cytological origin which shows the enzymic properties of « true » cholinesterase.

Zusammenfassung. — Verschiedene solubilisierete preparate von Cholinesterase sind erhalten worden ausgehend von subcellularen Fraktionen (mitochondrien und mikrosomen) von Ratten, Kaninchen und Kalb Hirn. Diese Preparate sind fraktioniert worden mittels Adsorptions- und Ionenaustausch-chromatographie und mittels Kolonne-Elektrophorese. Es wurde einige Beobachtungen mittels der analytischen Ultrazentrifuge hinzugefügt. Die untersuchten Preparate scheinen gebildet zu sein aus lipoproteischen Micellen mit wechselnden Dimensionen warscheinlich der Grösse der sierischen Lipoproteinen entsprechend. Die Kolonne-Elektrophorese der mittels nicht ionisch tensioaktiv solubilisierten Preparaten ermöglicht die Trennung von verschiedenen elektrophoretischen Komponenten. Die Kolinesterase findet man selektiv konzentriert in einem von geringer mobilität charakterisierten Komponenten. Das stellt ein gereinigtes Preparat der Cholinesterase dar. Das hat eine gut definiert cytologische Herkunft und enzymatische Eigenschaften entsprechend der « waren » Cholinesterase.

E' noto che la colinesterasi del tessuto nervoso è un enzima « insolubile », saldamente associato con le strutture cellulari (¹, ²). Nel corso di una ricerca sulle caratteristiche e sul significato di questa associazione (³, ⁴), si è ottenuta la «solubilizzazione» della colinesterasi del cervello, mediante opportuni trattamenti. Nel presente lavoro sono riferiti i risultati delle esperienze di frazionamento di tali preparazioni solubilizzate. A

questo fine si sono applicati diversi metodi di cromatografia di adsorbimento e a scambio ionico, come pure di elettroforesi di zona, su carta e su colonne di polvere di cellulosa. Questi dati sono integrati da alcune osservazioni compiute con l'ultracentrifuga analitica.

MATERIALI E METODI

Prodotti: « Lubrol W » (Imperial Chemical Industries Ltd). « Tween 20 » (Atlas Co.). Acetilcolina bromuro e butirilcolina ioduro (Hoffmann-La Roche). Acetil- β -metilcolina cloruro (Light Co).

Centrifughe: centrifuga « International » refrigerata Mod. PR-2. Centrifuga preparativa « Spinco » mod. L. tutti i valori indicati di forza centrifuga (g) sono calcolati sul raggio medio.

PREPARAZIONI SOLUBILIZZATE DI COLINESTERASI DEL CERVELLO

Tutte le operazioni erano eseguite al freddo ($0-4^{\circ}$), eccettuato il trattamento del materiale liofilizzato con i solventi organici.

Preparazione A) Cervello di vitello, prontamente prelevato e raffreddato in bagno di ghiaccio, è stato omogenizzato in « Blendor » con 10 volumi di saccarosio 0,25 M. L'omogenato è stato centrifugato a $1000 \times g$ per 10 min. Scartato questo sedimento, formato da nuclei e grossi frammenti cellulari, si è centrifugato il supernatante a $60.000 \times g$ per 2 ore, raccogliendo quindi il sedimento, formato da mitocondri. Questo sedimento è stato liofilizzato e successivamente trattato allo stato secco con solventi organici, secondo il metodo di MORTON (⁵). Il liofilizzato è stato sospeso per tre volte in *n*-butanolo (1 g in 50 cc) per 15 minuti a temperatura ambiente, e quindi centrifugato. Sono seguiti tre analoghi lavaggi con etere di petrolio, dopo di che il materiale si è lasciato per 12 ore in essiccatore su gel di silice, sotto tiraggio di pompa ad acqua. Quando il materiale così trattato è stato omogenizzato in tampone fosfati 0,1 M di pH 7,4 e quindi centrifugato per 2 ore a $105.000 \times g$ nella ultracentrifuga « Spinco » (rotore n. 40), si è ottenuto un sedimento giallo-bruno translucido, e un supernatante limpido e giallo tenue. Il 30-40% delle proteine e il 40-50% dell'attività colinesterasica della sospensione venivano recuperati nel supernatante, che costituiva la frazione « solubilizzata ».

Preparazione B) Cervello di coniglio veniva impiegato per un procedimento in tutto uguale, eccetto che un detergente non ionico (« Tween

20 » all'1%) veniva aggiunto al tampone fosfati usato per l'estrazione finale, allo scopo di ottenere una solubilizzazione più completa.

Preparazione C) I « microsomi » del cervello di ratto erano preparati da un omogenato in saccarosio 0,25 M. Dopo aver scartato il sedimento ottenuto centrifugando a $18.000 \times g$ per 15 min, si centrifugava il supernatante a $105.000 \times g$ per un'ora, raccogliendo il sedimento costituito dalla frazione microsomiale. I particolari del procedimento sono descritti in altra sede ⁽³⁾. I microsomi venivano quindi omogenizzati in saccarosio 0,25 M contenente un detergente non ionico (« Lubrol W » allo 0,8%) e centrifugati a $105.000 \times g$ per due ore. Si otteneva un supernatante limpido e colorato in giallo-rosa tenue e un sedimento più scuro e translucido. Circa il 60% delle proteine e l'80% dell'attività colinesterasica della sospensione si ritrovavano nel supernatante, che costituiva la frazione solubilizzata.

CROMATOGRAFIA DI ADSORBIMENTO SU FOSFATO DI CALCIO (IDROSSIAPATITE)

Si è seguito il metodo descritto da TISELIUS e coll. ⁽⁶⁾, con le leggere varianti introdotte da altri Autori ^(7, 8). In questo, come in tutti gli altri procedimenti cromatografici descritti in seguito, si è praticata l'eluzione con concentrazioni scalari di tampone (« stepwise elution »), raccogliendo le singole frazioni con un collettore del tipo « a tempo ». La densità ottica all'ultravioletto (280 m μ) delle singole frazioni si è determinata spettrofotometricamente e si è tenuta come misura della concentrazione in proteine.

CROMATOGRAFIA A SCAMBIO IONICO

La separazione di proteine mediante cromatografia a scambio ionico è stata sviluppata di recente, impiegando resine ovvero derivati della cellulosa. La prima applicazione di resine venne fatta da PALEUS e NEILANDS ⁽⁹⁾, usando la resina carbossilica IRC 50 per la purificazione del citocromo c. Il frazionamento di diversi enzimi mediante le resine « Dowex 2 » (scambiatrice di anioni) e « Dowex 50 » (scambiatrice di cationi) è stato descritto da BOMAN e coll. ^(10, 11). SOBER e PETERSON ^(12, 13) hanno descritto la preparazione e l'impiego di derivati della cellulosa, come la « carbossimetilcellulosa » e la N,N-dietilaminoetil-cellulosa. Un ampio resoconto sulla preparazione e l'impiego di questi ed altri derivati è svolto da PORATH ⁽¹⁴⁾, mentre le applicazioni alla separazione di enzimi diversi

sono estesamente riferite da BOMAN ⁽¹⁵⁾. A queste pubblicazioni rinviamo per una informazione più ampia e particolareggiata su queste tecniche.

I) *Resina « Dowex 2 »*. Si è seguita la tecnica descritta da BOMAN e WESTLUND ⁽¹¹⁾. Si è usata resina avente « cross linking » 8% e particelle di 200-400 « mesh », nella forma Cl⁻. Le colonne erano equilibrate con tampone Tris (idrossimetil)aminometano-HCl di pH 7,3 e lo stesso tampone si usava per l'eluzione con concentrazioni scalari.

II) *Derivati della cellulosa*. Si sono impiegati i seguenti derivati:

a) *Ossicellulosa* (« Oxidized cellulose powder »; -COOH 10-12%; Eastman Chemical Products);

b) *Carbossimetilcellulosa* (« CM-cellulose », preparata secondo SOBER e PETERSON ⁽¹²⁾, conteneva 0,43 meq. per g di peso secco);

c) *Sulfometilcellulosa* (« SM-cellulose », preparata secondo PORATH ⁽¹⁴⁾, conteneva 0,4 meq. per g di peso secco);

d) *Dietilaminoetilcellulosa* (« DEAE-cellulose », preparata secondo SOBER e PETERSON ⁽¹²⁾, conteneva 0,45 meq. per g di peso secco).

Tutti i suddetti derivati venivano sospesi e omogenizzati, rimuovendo le particelle più piccole per decantazione. La colonna veniva riempita con la sospensione e lo stivaggio si faceva per gravità, senza applicare particolare pressione. Essa veniva quindi equilibrata percolando con il tampone appropriato fino a pH costante. Si impiegavano colonne di piccole dimensioni (diametro mm. 9 e altezza del letto di cellulosa mm. 75 circa; « spazio morto » cc 5 circa), contenenti 0,5-1 g di cellulosa. Si raccoglievano frazioni di circa 1,5 cc. Alcune modalità particolari usate per i diversi derivati sono riferite qui di seguito.

a) e b) la colonna era preparata ed equilibrata con tampone fosfati;

c) la colonna era preparata con una sospensione in acqua, quindi lavata con HCl diluito, e quindi equilibrata con tampone fosfati;

d) la colonna era preparata con una sospensione della cellulosa nella forma -OH e quindi equilibrata col tampone fosfati appropriato.

ELETTROFORESI SU CARTA

Si è impiegata la tecnica usuale di elettroforesi in camera umida, con strisce di carta Whatman n. 1, larghe cm. 4 o 8 e sostenute da un ponte orizzontale lungo cm. 20. Si sono sperimentati tamponi diversi: fosfati

(pH 6,4 e *I* 0,10); veronal-acetato (pH 8,6 e *I* 0,10); borato (pH 8,6 e 9,2, *I* 0,06). I risultati migliori si sono ottenuti col tampone di borato di pH 8,6, preparato come segue: a 250 cc di soluzione madre (g 12,405 di H_3BO_3 e g 9,46 di Na_2SO_4 in 1 l) si aggiungono 60 cc di NaOH 0,2 M e si porta a 1 l. L'elettroforesi si svolgeva a temperatura ambiente di 18-20° per 7 ore, con 10-12 v/cm. Il campione era deposto a 6 cm dall'estremità catodica del tratto orizzontale della striscia. La colorazione delle proteine si faceva con Amidoschwarz 10 B. Le lipoproteine erano colorate con Sudanschwarz B.

La presenza della colinesterasi veniva rivelata mettendo in contatto la striscia, dopo l'elettroforesi, con uno strato di agar contenente l'adatto medium, con tampone, substrato e indicatore, secondo una tecnica già sperimentata nello studio elettroforetico della colinesterasi del tessuto elettrico⁽¹⁶⁾.

ELETTROFORESI SU COLONNE DI POLVERE DI CELLULOSA

Apparecchiature, procedimento e applicazioni di questo metodo sono stati ampiamente illustrati da PORATH^(17, 18), a cui rinviamo per informazioni più estese. Nei presenti esperimenti si è usata polvere di cellulosa « etanolizzata »⁽¹⁹⁾, preparata da noi stessi o di preparazione commerciale (« Munktell » cellulosa powder, Grycksbo Pappersbruk, Grycksbo, Sweden) senza riscontrare differenze sensibili. Prima dell'uso si aveva cura di essiccare la polvere (12 h a 80°) e quindi di setacciarla, scartando quella trattenuta da uno staccio di « 50 mesh » e raccogliendo quella trattenuta da uno staccio di 200 « mesh » (si usavano gli stacci standard della ditta « Endicotts »). Le dimensioni delle colonne impiegate, e le condizioni particolari di elettroforesi saranno indicate di volta in volta nel resoconto dei diversi esperimenti. Si è usato in tutti i casi il tampone di borato sopra descritto. Il raffreddamento delle colonne era ottenuto con circolazione d'acqua avente temperatura di 10°-12°. La raccolta delle frazioni si faceva con un collettore meccanico del tipo « a tempo ».

DETERMINAZIONE DELL'ATTIVITA' COLINESTERASICA

Nelle singole frazioni ottenute negli esperimenti di cromatografia ed elettroforesi si determinava l'attività della colinesterasi con un metodo pH-metrico con indicatore, simile a quello descritto da MALMSTRÖM e coll.⁽²⁰⁾. Un campione della frazione (se necessario previamente dializzato) era incubato a 30° in un medium contenente NaCl 0,1 M, veronal sodico 0,01 M, KH_2PO_4 0,02 M, HCl 0,0014 M $MgCl_2$ 0,001 M, acetil-

colina bromuro 0,01 M e bleu di bromotimolo 0,003%. Il pH era 7,6 e il volume finale 3 cc. Si misurava la densità ottica a 610 m μ al tempo 0 e dopo 30 e 60 min di incubazione a 30°. Si è presa come unità la variazione di 0,01 nella densità ottica a 610 m μ in 1 ora di incubazione (D_{610}/h).

Nei componenti elettroforetici, ottenuti riunendo insieme le singole frazioni corrispondenti ai diversi « picchi » separatasi nella elettroforesi su colonna, l'attività enzimatica si determinava col metodo manometrico nell'apparecchio di Warburg. Il medium conteneva NaCl 0,10 M, MgCl₂ 0,001M, NaHCO₃ 0,03 M e acetilcolina bromuro 0,01 M. Il volume finale era di 2 cc e la temperatura 30°. L'attività si è espressa come μ l di CO₂ liberati in 1 h.

DETERMINAZIONE DELLE PROTEINE

Si è usato il metodo colorimetrico di GORNALL et al. ⁽²¹⁾ fondato sulla reazione del biureto, e in alcuni casi quello, più sensibile, di LOWRY et al. ⁽²²⁾. Opportune curve di taratura erano preparate con sieroalbumina umana.

ESAME CON L'ULTRACENTRIFUGA ANALITICA

Si è usata la ultracentrifuga analitica « Spinco » modello E, con il rotore A. Si centrifugava alla velocità di 59.780 giri/min, pari a una forza centrifuga di $197.000 \times g$ (raggio medio), alla temperatura di 20°. Le costanti di sedimentazione riportate sono indicate in unità Svedberg (S) e sono corrette in riferimento alla sedimentazione in H₂O a 20°. Le condizioni particolari dei singoli esperimenti saranno indicate caso per caso.

RISULTATI

CARATTERISTICHE DI SOLUBILITA' DELLE DIVERSE PREPARAZIONI.

La Preparazione A) ha dimostrato scarsa solubilità: si è avuta precipitazione per dialisi prolungata contro acqua, e per abbassamento del pH a circa 6. Per aggiunta di solfato ammonico a concentrazioni scalari essa precipita fra il 15 e il 60% di saturazione. I precipitati così ottenuti non si ridisciolgono in tampone fosfati 0,1 M di pH 7,6, neppure dopo dialisi prolungata.

La Preparazione C) dimostra invece alta solubilità. E' precipitabile

con solfato ammonico (tra il 25 e il 65% di saturazione). Questi precipitati si ridisciolgono perfettamente in acqua e contengono evidenti quantità di tensioattivo. Questo è molto difficile da rimuovere, anche estraendo a fondo con solventi organici il precipitato liofilizzato, e apparentemente la solubilità del materiale dipende strettamente dal tensioattivo associatovi.

CROMATOGRAFIA DI ADSORBIMENTO SU FOSFATO DI CALCIO.

I risultati di un esperimento tipico sono illustrati nel diagramma in Fig. 1. Un campione della preparazione A (solubilizzata con butanolo) contenente 6 mg di proteine, previamente dializzato contro tampone fo-

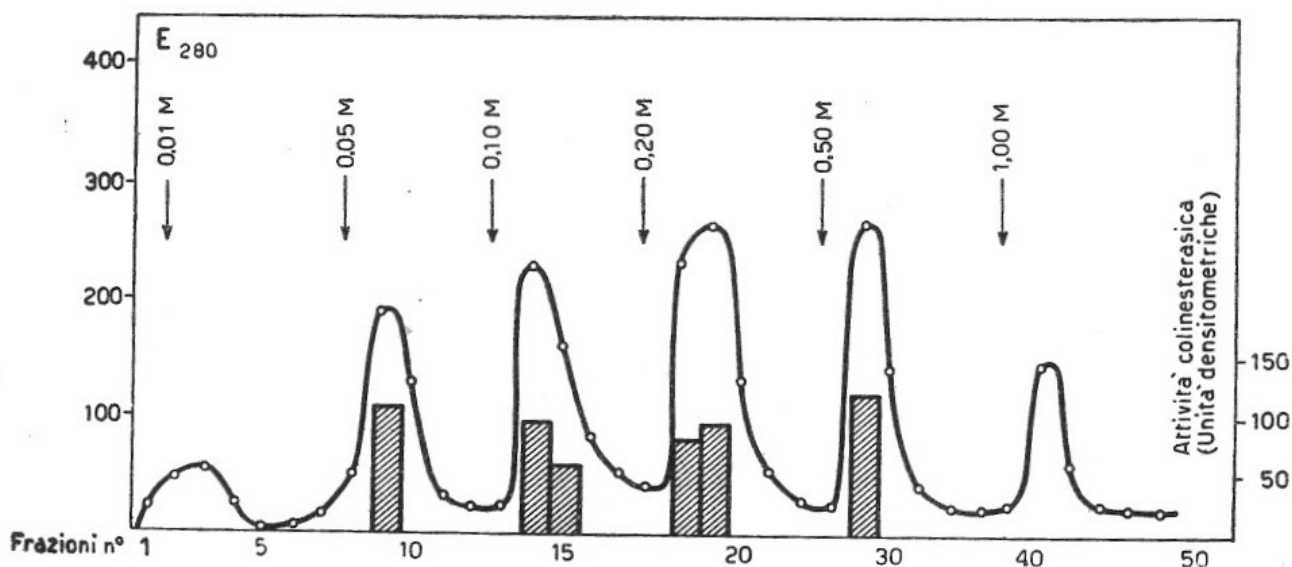


Fig. 1. - Cromatografia su idrossiapatite della Preparazione A (6 mg). Colonna di 9 mm di diametro, altezza 100 mm, equilibrata con tampone fosfati 0,01 M di pH 6,8. Le frecce indicano l'inizio della eluzione con le diverse concentrazioni del tampone (frazioni di 3 cm³). La linea congiungente i cerchi indica l'estinzione a 280 mμ, mentre le colonne tratteggiate indicano l'attività enzimatica, in unità densitometriche per cm³.

sati 0,01 M di pH 6,8, è stato applicato su una colonna di idrossiapatite (diametro 9 mm, altezza 100 mm) previamente equilibrata con lo stesso tampone. Sia il materiale proteico che l'attività risultavano quasi completamente adsorbiti. L'eluzione con concentrazioni crescenti dello stesso tampone, raccogliendo frazioni di 3 cc ogni 15 min, ha dato luogo a una serie di « picchi » di materiale proteico ai quali corrispondono altrettanti « picchi » di attività enzimatica, senza che si verifichi una separazione selettiva dell'attività in una frazione particolare. Il recupero delle proteine e dell'attività è elevato (circa il 90%). Non si osserva adsorbimento irreversibile.

L'uso di preparazioni diverse ovvero variazioni delle condizioni sperimentali, come l'aggiunta di tensioattivi, o un diverso pH, o differenti concentrazioni scalari di tampone, non hanno dato risultati sensibilmente diversi.

CROMATOGRAFIA A SCAMBIO IONICO.

« *Dowex 2* ». In un esperimento tipico, un campione di 6 mg di proteine, (preparazione A), venne applicato su una colonna del volume di 30 cc, previamente equilibrata con tampone Tris-HCl 0,01 M di pH 7,3. Sia le proteine che l'attività venivano adsorbiti quasi completamente. Anche in questo caso l'eluizione a concentrazioni scalari, con frazioni di 3,5 cc ogni 20 min ha dato una serie di picchi di materiale proteico e di attività, senza separazione preferenziale dell'attività in un picco particolare. Anche qui la variazione delle preparazioni o delle condizioni di cromatografia non ha dato risultati sensibilmente differenti. Il recupero del materiale e dell'attività è stato basso.

Ossicellulosa. Un campione di 7 mg di proteine (Preparazione A) è stato applicato su una colonna (diametro mm 9, altezza mm 60), equilibrata con tampone fosfati 0,05 M pH 6,7. Non si è verificato nessun adsorbimento di materiale né di attività, che si sono recuperati completamente nel primo effluente.

Carbossimetilcellulosa. Per ottenere le condizioni più favorevoli all'adsorbimento, si è usata una colonna (diametro mm 9 e altezza mm 60) equilibrata con tampone fosfati 0,01 M di pH 5,9. Il campione esaminato conteneva 3 mg di proteine. A questo pH la solubilità della preparazione è scarsa e si forma un certo precipitato, per cui è utile aggiungere una piccola quantità di tensioattivo non ionico (« Tween 20 »). Anche in questo esperimento l'adsorbimento è stato praticamente nullo.

Sulfometilcellulosa. Si è eseguito un esperimento con una colonna (mm 9 per 60) equilibrata con tampone fosfati 0,05 M di pH 6,1, contenente « Tween 20 » 0,1%. Il campione di 8 mg di proteina (Preparazione B) era disciolto nello stesso mezzo. Non si è verificato adsorbimento. In un secondo esperimento, usando tampone 0,005 M di pH 5,9, con « Tween 20 » 0,2%, e un campione di mg 5 di proteina, non vi è stato nel pari alcun adsorbimento. Il recupero era praticamente completo nel primo effluente.

Dietilaminoetilcellulosa. Un campione di 5 mg di proteina (Preparazione B) si è applicato su una colonna (mm 9 per 60) di cellulosa in forma -OH, equilibrata con tampone fosfati 0,05 M di pH 6,85 con « Tween

20 » 0,2%. Circa il 24% del materiale proteico e il 14% dell'attività sono stati raccolti nel primo effluente, mentre circa il 43% e rispettivamente il 48% risultavano adsorbiti ed erano successivamente eluiti con tampone 1 M. Si è avuto un recupero di circa il 65% senza che si verificasse una differenza sensibile di attività specifica fra la frazione adsorbita, quella non adsorbita e il materiale di partenza.

ELETTROFORESI SU CARTA.

Preventivamente all'elettroforesi su colonna ogni preparazione è stata sottoposta ad elettroforesi su carta, onde ritrovare le condizioni più opportune di frazionamento. Si sono provati tamponi di diversa composizione e di diverso pH (6,4; 8,6; 9,2). I risultati migliori si ottenevano

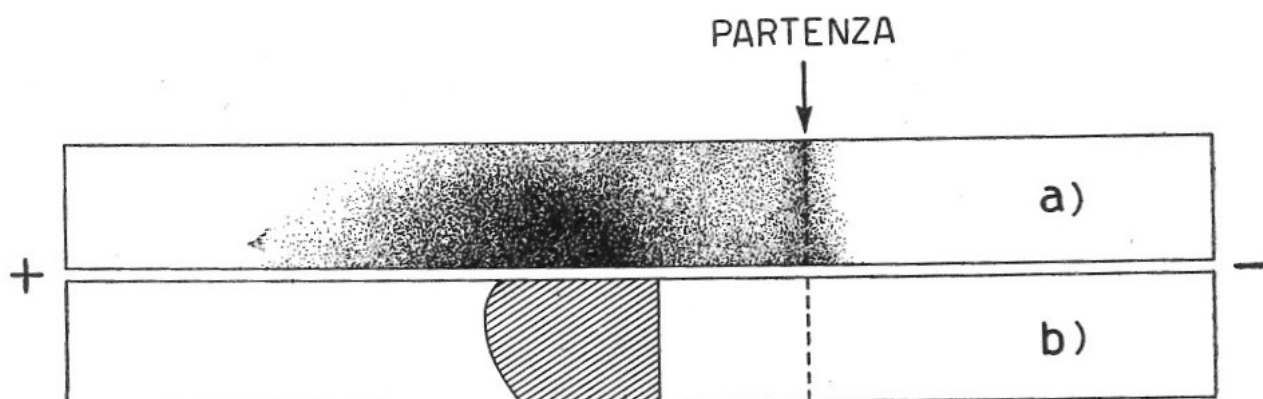


Fig. 2. - *Elettroforesi su carta della Preparazione B* (contenente Tween 20). Disegno schematico. Tampone di borato pH 8,6 e I 0,06. 10 V/cm per 7 ore. La striscia è tagliata in due metà: nella metà a), colorata con Amidoblack, è visibile una larga banda di materiale proteico. Nella metà b), su cui si è rivelata direttamente l'attività enzimatica, si osserva che questa forma una banda in corrispondenza della metà posteriore della banda di proteine.

con tampone borato di pH 8,6 e I 0,06, che si è quindi adottato per l'elettroforesi su colonna.

Con la Preparazione A si è potuta rilevare la migrazione di una sola larga banda di proteine, senza zone distintamente separate. Si è osservato un notevole adsorbimento del materiale nel tratto percorso. L'attività colinesterasica è stata rivelata direttamente sulla striscia, che dopo l'elettroforesi si poneva in contatto con una piastra d'agar contenente substrato, tampone e indicatore. Si è osservata una zona di attività che si sovrapponeva alla banda formata dal materiale proteico. La colorazione con Sudanschwarz ha rivelato la presenza di lipidi.

Con la Preparazione B (contenente « Tween 20 ») si è ottenuta del pari una sola larga banda di materiale proteico, ma la zona di attività enzimatica era spostata nettamente nella parte posteriore della banda, come è illustrato nel disegno schematico in Fig. 2.

ELETTROFORESI SU COLONNA.

Con la Preparazione A si sono eseguiti due esperimenti, entrambi su colonna di 3 cm. di diametro, con un letto di polvere di cellulosa alto 50 cm., preparata col tampone di borato sopra descritto. Un campione contenente circa 100 mg di proteina veniva preventivamente dializzato contro lo stesso tampone e quindi filtrato per una piccola colonna (volume circa 5 cc) preparata con la stessa polvere di cellulosa, senza che

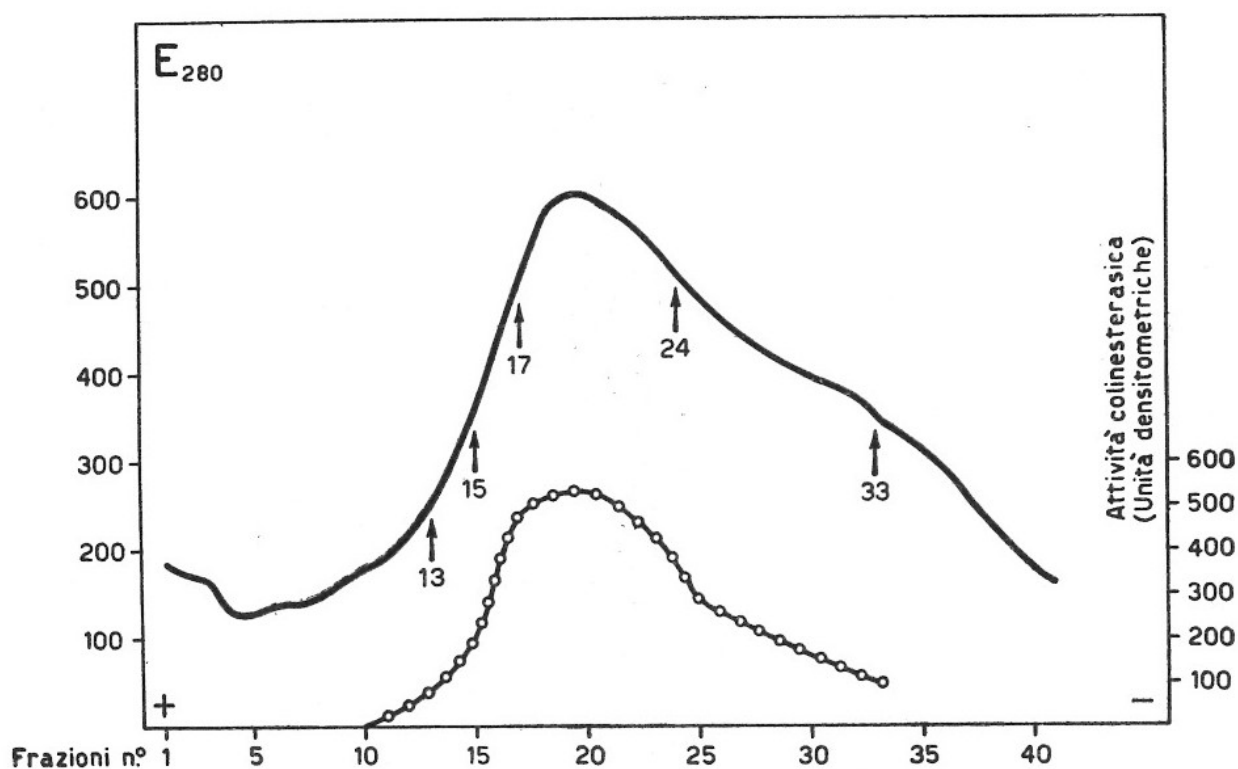


Fig. 3. - *Elettroforesi su colonna della Preparazione A* (solubilizzata con butanolo). Colonna di diametro 3 cm. e altezza 50 cm.; tampone di borato pH 8,6 e I 0,06; campione contenente circa 100 mg di proteina. Elettroforesi per 16 h con 320 v e 45 mA. Eluzione con frazioni di 5 cm³ ogni 10 min. I segni (+) e (—) indicano la posizione dell'anodo e del catodo. La linea (—) indica la densità ottica all'ultravioletto (280 m μ). La linea (—o—o—o) indica l'attività colinesterasica, misurata con metodo pH-metrico e data in unità densitometriche per cm³. Le frecce indicano le singole frazioni che sono state impiegate con l'elettroforesi su carta illustrata in Fig 4.

si riscontrasse adsorbimento evidente del materiale. Questo campione era quindi sottoposto ad elettroforesi per 16 ore, con circa 320 v agli elettrodi e 45 mA. La colonna è stata eluita con lo stesso tampone, raccogliendo frazioni di 5 cc ogni 10 min. Su ogni singola frazione si è determinata la densità ottica all'ultravioletto (280 m μ) e si è saggiata l'attività enzimatica. I risultati ottenuti sono illustrati nella Fig. 3 (relativa al secondo esperimento). In ambo i casi si è ottenuto un solo largo

« picco » di materiale proteico. Alcune frazioni singole, corrispondenti a zone diverse del picco, sono state concentrate e sottoposte ad elettroforesi su carta, deponendo i diversi campioni in parallelo sulla stessa striscia. Le diverse frazioni hanno formato bande che migravano con diversa mobilità, in rapporto con la posizione delle corrispondenti zone

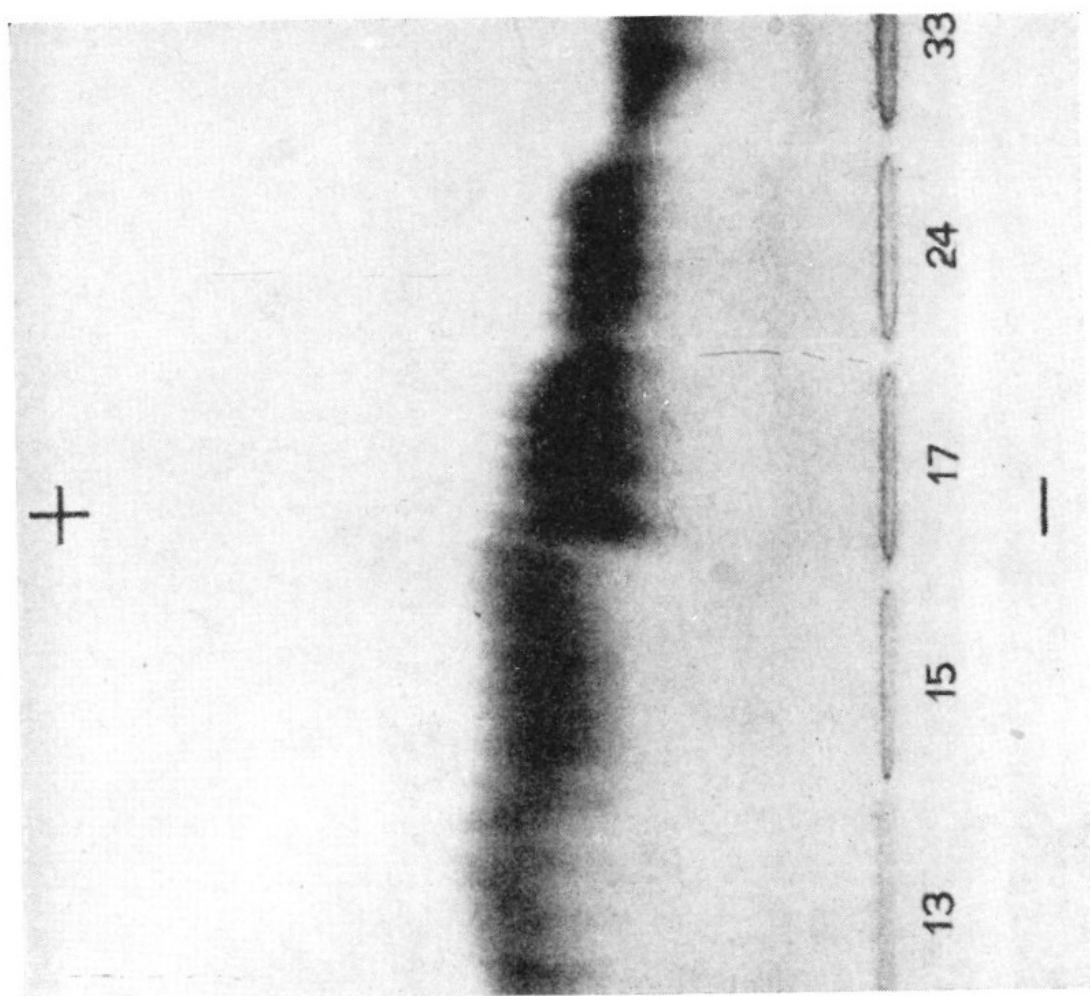


Fig. 4. - Elettroforesi su carta di singole frazioni dell'esperimento illustrato in Fig. 3. Il numero di ogni frazione corrisponde con quello indicato sul tracciato in Fig. 3. Le frazioni sono state deposte in parallelo sulla stessa striscia e sottoposte contemporaneamente alla elettroforesi (7 ore con 10 v/cm).

del picco (vedi Fig. 4). Questo conferma le differenti caratteristiche elettroforetiche del materiale separatosi nelle varie zone del picco.

Anche l'attività colinesterasica risultava distribuita in un largo picco che si sovrapponeva con quello delle proteine. Non si è verificata una separazione preferenziale dell'attività in alcuna particolare frazione.

Con la Preparazione B si è eseguito un analogo esperimento, frazionando un campione di 50 mg di proteine su una colonna delle dimensioni di cui sopra, preparata con lo stesso tampone. L'elettroforesi è durata 23

ore con circa 400 v agli elettrodi e circa 45 mA. Si eluiva raccogliendo frazioni di 5 cc ogni 10 min. I risultati sono illustrati in Fig. 5. Si è osservata la separazione di tre larghi picchi di materiale proteico (indicati nell'ordine come I - II - III) mentre l'attività enzimatica formava un picco principale nella zona del III° picco proteico (il meno mobile). Le singole frazioni corrispondenti ad ognuno dei tre picchi di proteine sono state riunite a formare tre componenti elettroforetici (I-II-III) i quali sono

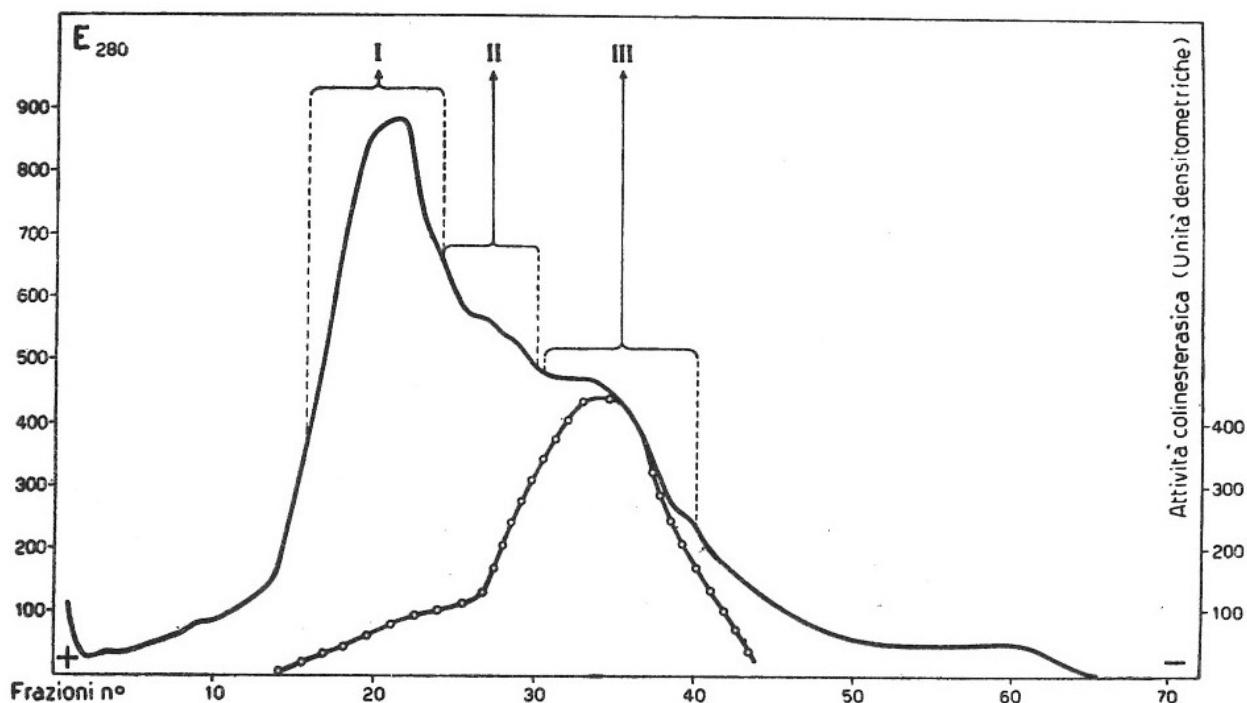


Fig. 5. - Elettroforesi su colonna della Preparazione B (contenente « Tween 20 »). Colonna, tampone, condizioni di eluzione, simboli e abbreviazioni come in Fig. 3. Campione di 50 mg di proteine. Elettroforesi per 23 h con 400 v e 45 mA. I diversi componenti elettroforetici sono contraddistinti da un numero d'ordine (I-II-III).

stati liofilizzati e quindi sottoposti ad elettroforesi su carta. Il componente I dimostrava un forte adsorbimento sulla carta, lasciando una traccia intensa sul tratto percorso, mentre il componente III migrava senza dar luogo ad adsorbimento, formando una banda in quella zona in cui si era messa in evidenza l'attività nel previo esperimento di elettroforesi su carta (Fig. 2). Il componente III conteneva una evidente quantità di tensioattivo. Il contenuto in proteine del campione sottoposto all'elettroforesi e dei componenti I e III è stato determinato con il metodo del biureto, mentre la rispettiva attività colinesterasica si è determinata manometricamente. La rispettiva attività specifica (espressa come μl di CO_2 liberati in 1 h da 1 mg di proteina) è stata la seguente: Preparazione B = 362; componente I = 44; componente III = 765.

Un secondo esperimento con la preparazione B è stato eseguito su

una colonna più stretta e più alta (diametro 2 cm. e altezza 100 cm.) che consentiva una elettroforesi più prolungata ed un voltaggio più elevato. Un campione di 30 mg di proteine è stato frazionato per 40 ore, con circa 880 v e 35 mA. Si è eluito raccogliendo frazioni di 5 cc ogni 10 min. Il diagramma riportato in Fig. 6 mostra che si è ottenuta la separazione di 4 componenti proteici (I - II - III - IV) mentre l'attività si è distribuita

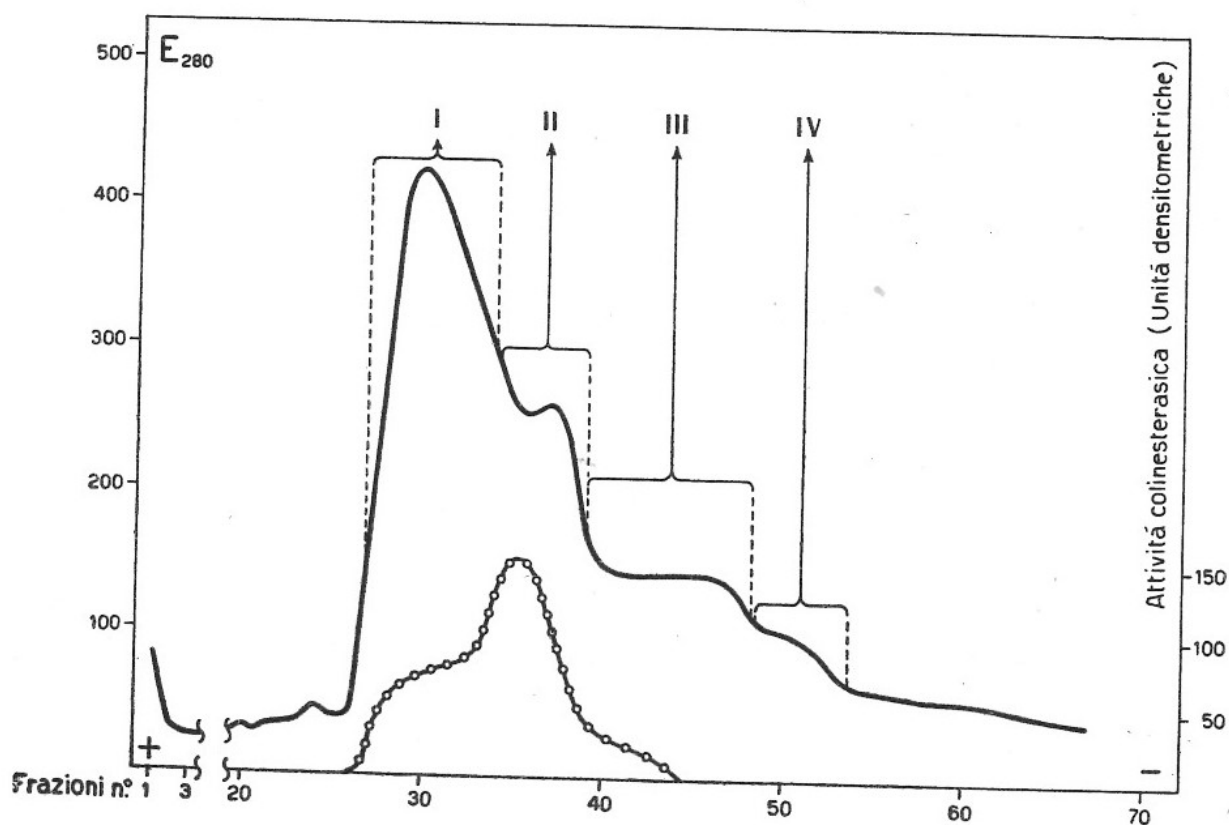


Fig. 6. - *Elettroforesi su colonna della Preparazione B* (contenente « Tween 20 »). Colonna di diametro 2 cm e altezza 100 cm. Tampone, condizioni di eluzione e simboli come in Fig. 3. - Campione di 30 mg di proteine. Elettroforesi per 40 h con 880 v e 35 mA. I diversi componenti elettroforetici sono contraddistinti da numeri d'ordine (I-II-III-IV).

in due picchi consecutivi: il primo, minore, nella zona del componente I e il secondo, maggiore, nella zona del componente II, e in parte del III. L'attività specifica dei tre componenti, determinata manometricamente ed espressa come μl di CO_2 per mg di proteina per h, era: I = 73; II = 313; III = 103. Anche in questi componenti era evidente la presenza del tensioattivo (« Tween 20 »).

Un frazionamento elettroforetico particolarmente efficace si è ottenuto con la Preparazione C (dai microsomi del cervello di ratto solubilizzati col tensioattivo non ionico « Lubrol W »). La frazione solubilizzata veniva adsorbita su una colonna di fosfato di calcio, equilibrata con tampone fosfati 0,01 M pH 6,8. Il saccarosio e il tensioattivo in eccesso

venivano così allontanati col primo effluente, mentre oltre il 90% delle proteine e dell'attività venivano adsorbiti, e quindi eluiti con tampone 0,5 M di pH 7,7, dializzati e opportunamente concentrati per ultrafiltrazione. Un campione contenente 18 mg di proteine è stato allora sottoposto all'elettroforesi su una colonna (diametro 2 cm., altezza 90 cm.) preparata con il solito tampone di borato. Si sono applicati circa 600 v, con 32 mA,

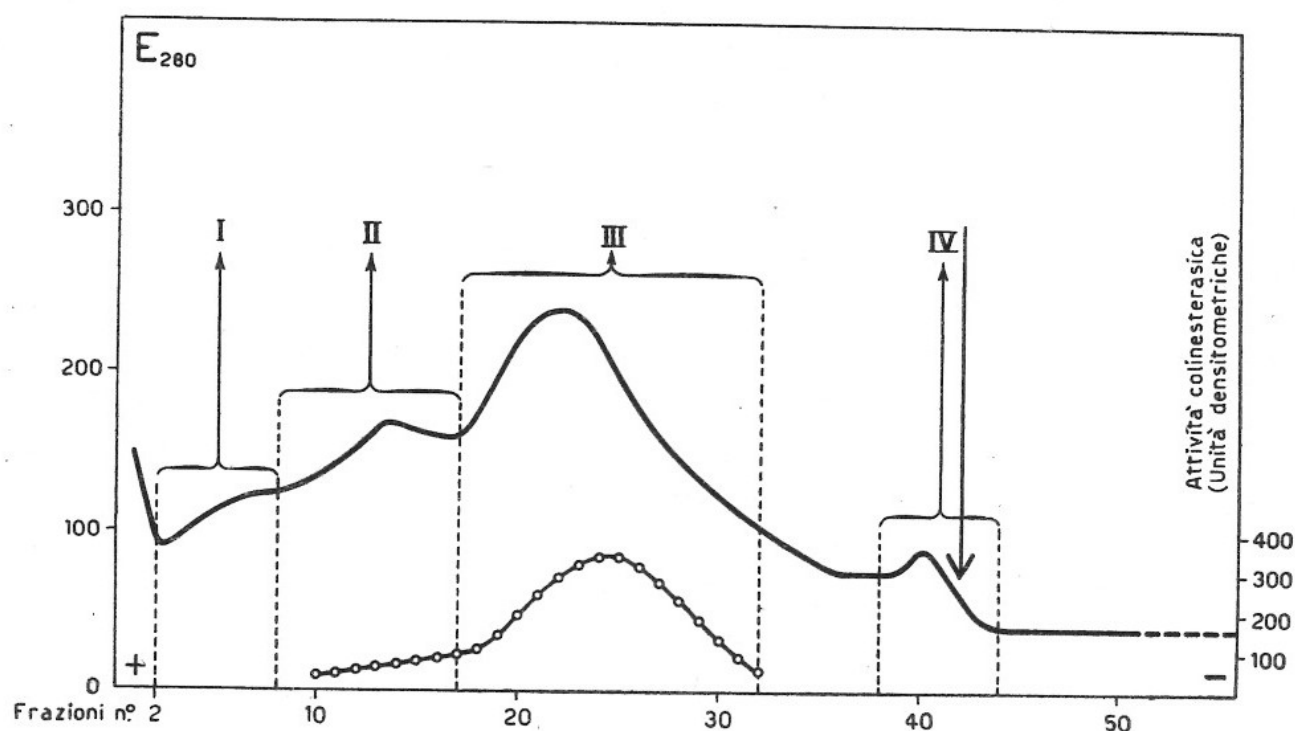


Fig. 7. - *Elettroforesi su colonna della Preparazione C* (dai microsomi di cervello, solubilizzati con «Lubrol W»). Colonna di diametro 2 cm e altezza 90 cm. Tampone, eluzione e simboli come in Fig. 3. Elettroforesi per 70 h con 600 v e 32 mA. I diversi componenti elettroforetici sono contraddistinti da numeri d'ordine (I-II-III-IV). La freccia indica la zona di partenza.

TABELLA 1.

	Proteine		Attività della colinesterasi		
	Totale mg	Recupero %	Totale $\mu\text{l CO}_2/\text{h}$	Recupero %	Att. specifica $\mu\text{l CO}_2/\text{h}$
Campione di preparazione C	18		2.760		153
Componente I	2,52	14	193	7	76
Componente II	4,50	25	510	18,4	113
Componente III	7,30	40,5	2.000	72,5	285
Componente IV	0,70	3,9	134	4,8	193

per 70 ore. Si è eluito raccogliendo frazioni di 5 cc ogni 10 min. Il diagramma riportato in Fig. 7 illustra i risultati dell'esperimento. Si è ottenuta la separazione di quattro componenti elettroforetici (I-II-III-IV), mentre l'attività colinesterasica si trova raccolta a formare un solo picco nella zona del componente III. Le singole frazioni corrispondenti ad ognuno dei componenti sono state riunite e in ogni componente si sono determinati il contenuto in proteine [col metodo di LOWRY et al. ⁽²²⁾] e in colinesterasi (col metodo manometrico). I dati riportati nella Tabella 1 mostrano che oltre il 72% dell'attività, insieme con il 42% delle proteine, si è recuperato nel componente III. L'attività specifica è fortemente aumentata nel componente III (186% rispetto alla preparazione di partenza) e nettamente ridotta nei componenti I e II, dimostrando così la definita separazione del materiale attivo nella zona del componente III. Le caratteristiche enzimatiche del componente III sono state saggiate valutandone l'attività esterasica su diversi substrati: acetilcolina 0,01 M; acetil- β -metilcolina 0,03 M e butirilcolina 0,03 M. L'attività relativa è stata: acetilcolina = 100; acetil- β -metilcolina = 52; butirilcolina = 2. L'attività appare dovuta interamente alla colinesterasi « vera », che ha dimostrato un simile rapporto di attività con i diversi substrati, nello studio svolto da DAVISON ⁽²³⁾ sulle colinesterasi del cervello di ratto.

OSSERVAZIONI CON L'ULTRACENTRIFUGA ANALITICA.

Un campione della Preparazione A (solubilizzata con butanolo) e uno della Preparazione C (solubilizzata col tensioattivo non ionico « Lubrol W ») sono stati esaminati con la metodica sopra descritta.

Come si osserva in Fig. 8, la Preparazione C mostra la presenza di un componente principale che tende ad « allargarsi » e ad appiattirsi rapidamente, probabilmente perché formato da micelle distribuite in una ampia serie di dimensioni. La costante di sedimentazione è di circa 3,7 S.

La Preparazione A (Fig. 9) risulta costituita da un picco principale, anch'esso piuttosto ampio, avente una costante di sedimentazione di circa 5 S. E' accennata sul tracciato la presenza di un componente minore a sedimentazione più rapida.

Apparentemente la Preparazione A è costituita di micelle aventi maggiori dimensioni ovvero maggior peso specifico che le micelle della Preparazione C. Questo potrebbe esser dovuto al minor contenuto in lipidi, rimossi dai solventi organici.

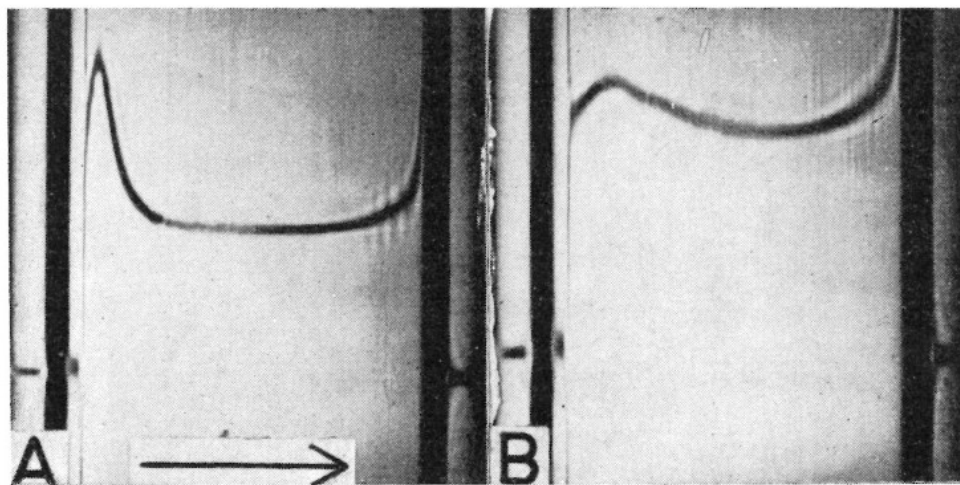


Fig. 8. - *Sedimentazione della Preparazione C nella ultracentrifuga analitica « Spinco ».* Campione contenente 5 mg di proteine per cm^3 . La sedimentazione si è svolta in tampone fosfati 0,05 M di pH 7,5, nel rotore A, a 59.000 giri/min (pari a $197.000 \times g$) a 20° . Il fotogramma A è preso dopo 5 min, quello in B dopo 37 min. La freccia indica la direzione della sedimentazione. La costante di sedimentazione è di circa 3,7 S (corretta per sedimentazione in H_2O a 20°).

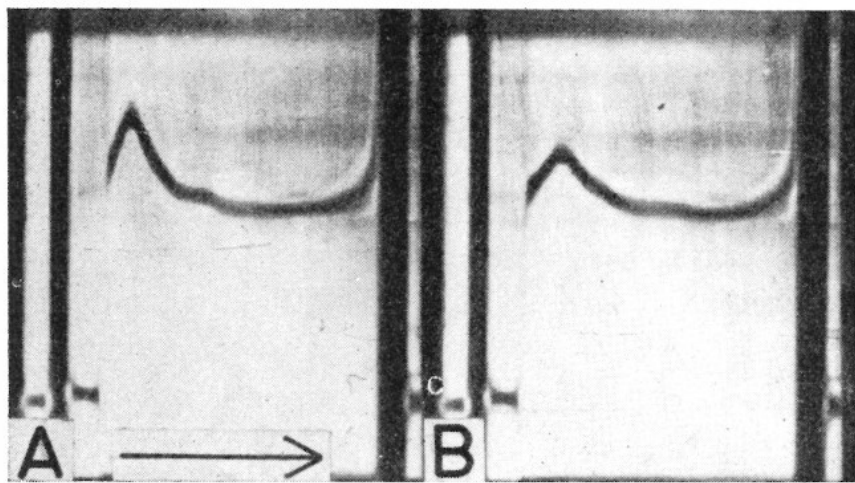


Fig. 9. - *Sedimentazione della Preparazione A nella ultracentrifuga analitica.* Condizioni sperimentali e simboli come in Fig. 8. Il fotogramma in A è preso dopo 13 min, quello in B dopo 21 min. La costante di sedimentazione è di circa 5 S.

DISCUSSIONE

Sono da considerare in primo luogo la origine citologica e la possibile natura delle preparazioni solubilizzate di colinesterasi del cervello. Queste sono ottenute trattando le strutture lipoproteiche delle cellule nervose (nel caso presente le membrane dei mitocondri e microsomi) con agenti tensioattivi non ionici ovvero con solventi organici a secco. Per quanto ci è noto finora dalla letteratura (²⁴) queste membrane sono formate da una trama proteica disposta a formare uno strato su cui sono orientate in strati regolari le molecole di fosfolipidi. Secondo le ipotesi più recenti (²⁵, ²⁶) la solubilizzazione delle membrane ad opera di tensioattivi non ionici avviene con un'azione puramente fisica, per l'abbassamento della tensione di superficie al di sotto di un certo limite, raggiunto a una data concentrazione del tensioattivo. In tali condizioni si verifica una progressiva frammentazione del complesso lipoproteico come tale in micelle lipoproteiche, associate con molecole del tensioattivo che ne accrescono l'idrofilia. Il distacco di fosfolipidi liberi è minimo o nullo.

Nella solubilizzazione prodotta dal trattamento preventivo, a secco, con solventi organici si ha in primo luogo il distacco di una quantità notevole di fosfolipidi e di colesterolo. Questo determina successivamente, in presenza d'acqua, la idratazione del complesso lipoproteico e la sua frammentazione in micelle aventi caratteristiche probabilmente diverse per solubilità, dimensioni, densità e contenuto lipidico, da quelle prodotte dai tensioattivi.

E' opportuno considerare e confrontare le caratteristiche chimico-fisiche dimostrate da queste due diverse preparazioni solubilizzate. La quota di materiale lipoproteico solubilizzato dal pretrattamento con solventi organici è minore. Queste preparazioni hanno solubilità scarsa. Un'altra caratteristica è il mancato adsorbimento su ogni tipo di cellulosa scambiatrice di cationi provata (ossicellulosa, carbossimetilcellulosa e sulfometilcellulosa), anche a pH relativamente basso (5,9) e a concentrazioni minime di tampone. Sottoposto a cromatografia di adsorbimento su idrossiapatite e a cromatografia a scambio ionico su resina e cellulosa scambiatrici di anioni (« Dowex 2 » e « DEAE-cellulose »), questo materiale si è suddiviso in diverse frazioni, separate a diverse concentrazioni di eluente. In nessuna di tali frazioni si è verificata una concentrazione selettiva della colinesterasi. Il frazionamento elettroforetico su carta e su colonne di cellulosa non ha dato luogo né alla separazione di distinti componenti elettroforetici né alla concentrazione della colinesterasi in una zona particolare del diagramma elettroforetico. Da questi risultati appare verosimile che la frammentazione del complesso lipo-

proteico abbia prodotto un'ampia serie di micelle le quali, per le loro diverse caratteristiche, si separano nelle diverse frazioni cromatografiche ed elettroforetiche ottenute nei presenti esperimenti. La colinesterasi è apparentemente distribuita in modo uniforme in questa serie di micelle.

Se d'altra parte consideriamo la solubilizzazione ottenuta con i tensioattivi non ionici, constatiamo che essa si è dimostrata più completa e ha dato luogo a un materiale proteico dotato di alta solubilità. I risultati della cromatografia di adsorbimento e a scambio ionico su queste preparazioni non sono dissimili da quelli ottenuti con le preparazioni solubilizzate dai solventi organici. Una netta differenza si è riscontrata invece nei risultati della elettroforesi di zona. Questa ha permesso la separazione di 4 distinti componenti elettroforetici, e dell'attività colinesterasica in corrispondenza di uno di tali componenti. (Un simile risultato si è osservato anche per il materiale precedentemente trattato a secco con i solventi organici, e poi solubilizzato in presenza di tensioattivi, cioè la Preparazione B).

Le micelle formatesi per effetto del tensioattivo appaiono dunque diverse da quelle prodotte dal trattamento con solventi organici, per la possibilità di separarle in componenti elettroforetici distinti e caratterizzati anche da un diverso contenuto di colinesterasi. Questo enzima risulta associato con una determinata classe di micelle, che forma un componente elettroforetico a mobilità relativamente minore. Questa caratteristica elettroforetica può trovare una spiegazione nel fenomeno osservato da diversi Autori, i quali hanno esaminato l'effetto dell'aggiunta di tensioattivi sulla separazione elettroforetica delle proteine sieriche (²⁷, ²⁸). La mobilità delle frazioni lipoproteiche viene nettamente aumentata dai tensioattivi anionici e diminuita dai cationici, verosimilmente per l'apporto di cariche elettriche nei complessi da questi formati con le lipoproteine.

Anche i tensioattivi non ionici, come il Tween, riducono molto la mobilità, verosimilmente per un forte aumento di massa rimanendo invariata la carica. Riguardo al componente elettroforetico in cui si è concentrata la colinesterasi, era evidente in esso la presenza di una notevole quantità di tensioattivo.

Anche l'esame con l'ultracentrifuga analitica suggerisce che le preparazioni solubilizzate qui esaminate sono costituite da micelle lipoproteiche, distribuite in un'ampia serie di dimensioni. Queste sono comunque molto ridotte, anche tenendo conto di un peso specifico probabilmente basso. Le costanti di sedimentazione osservate (3,7 e 5 S) sono dello stesso ordine di quelle delle lipoproteine sieriche (²⁹), e in ogni caso nettamente inferiori a quelle osservate per le più minute strutture submicroscopiche ritrovabili nella frazione microsomiale del cervello (³).

In conclusione possiamo rilevare che il frazionamento elettroforetico su colonna delle preparazioni solubilizzate con tensioattivi non ionici consente di separare un componente elettroforetico definito in cui la colinesterasi è selettivamente concentrata. Esso rappresenta una preparazione purificata dell'enzima, ottenuta con resa elevata da ben definite strutture cellulari e avente caratteristiche enzimatiche corrispondenti a quelle della colinesterasi « vera » ⁽²³⁾.

Roma. — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di Biologia.

BIBLIOGRAFIA

- (¹) ORD M. G. e THOMPSON R. H. S. - Biochem. J., 49: 191 (1951).
- (²) NATHAN P. e APRISON M. H. - Federation Proc., 14: 106 (1955).
- (³) TOSCHI G. - Exptl. Cell Research, (in corso di stampa).
- (⁴) HANZON V. e TOSCHI G. - Exptl. Cell Research, (in corso di stampa).
- (⁵) MORTON R. K. - Methods in Enzymology, 1: 46 (1955).
- (⁶) TISELIUS A., HJERTEN S. e LEVIN Ö. - Arch. Biochem. Biophys., 65: 132 (1956).
- (⁷) HJERTEN S. - Biochim. et Biophys. Acta, (in corso di stampa).
- (⁸) ANACKER W. F. - Biochem. Z., 330: 141 (1958).
- (⁹) PALEUS S. e NEILANDS G. B. - Acta Chem. Scand., 4: 1024 (1950).
- (¹⁰) BOMAN H. G. - Arkiv Kemi, 12: 453 (1958).
- (¹¹) BOMAN H. G. e WESTLUND L. - Arch. Biochem. Biophys., 64: (1957).
- (¹²) PETERSON E. A. e SOBER H. A. - J. Am. Chem. Soc., 78: 751 (1956).
- (¹³) SOBER H. A., GUTTER F. J., WYCKOFF M. M. e PETERSON E. A. - J. Am. Chem. Soc., 78: 756 (1956).
- (¹⁴) PORATH J. - Arkiv Kemi, 11: 97 (1957).
- (¹⁵) BOMAN H. G. - Ph. D. Thesis, Institute of Biochemistry, Uppsala, Sweden (1958).
- (¹⁶) TOSCHI G. e MARINI-BETTOLO G. B. - Biochim. et Biophys. Acta, 21: 531 (1956).
- (¹⁷) PORATH J. - Biochim. et Biophys. Acta, 22: 151 (1956).
- (¹⁸) GEDIN H. e PORATH J. - Biochim. et Biophys. Acta, 26: 159 (1957).
- (¹⁹) FLODIN P. e KUPKE D. W. - Biochim. et Biophys. Acta, 21: 368 (1956).
- (²⁰) MALMSTRÖM B. G., LEVIN Ö. e BOMAN H. G. - Acta Chem. Scand., 10: 1077 (1956).
- (²¹) GORNALL A. G., BARDAWILL C. J. e DAVID M. M. - J. Biol. Chem., 177: 751 (1949).
- (²²) LOWRY O. H., ROSEBROUGH N. J., FARR A. L. e RANDALL R. G. - J. Biol. Chem., 193: 265 (1951).
- (²³) DAVISON A. N. - Biochem. J., 54: 583 (1953).
- (²⁴) DE ROBERTIS E. D. P., NOWINSKI W. W. e SAEZ F. A. - « General Cytology », p. 160, Saunders, Philadelphia (1955).
- (²⁵) RIDEAL E. - Proc. Roy. Soc., B, 146, 225 (1957).
- (²⁶) SCHULMANN J. H., PETHICA B. A., FEW A. W. e SALTON M. R. J. - Progr. Biophys., 5: 41 (1955).
- (²⁷) MORA R., REBEYROTTE P. e POLONOVSKI J. - Bull. Soc. Chim. Biol., 37: 957 (1955).
- (²⁸) GRUNDI S., DOBSON H. L. e GRIFFIN A. C. - Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 98: 313 (1958).
- (²⁹) HUGHES W. L. - « The proteins », edited by H. Neurath e K. Bailey, II, B, 740 Academic Press, New York (1954).

Direttore responsabile: Prof. DOMENICO MAROTTA

Reg. Stampa - Trib. di Roma n. 1534 del 14 luglio 1956