



УДК 577.152.341.042:577.112.4.088.6

## СИНТЕЗ МЕЧЕННОГО ТРИТИЕМ N,N-ДИМЕТИЛ-2-ФЕНИЛАЗИРИДИНИЯ И ЕГО РЕАКЦИЯ С АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗОЙ

Палуца И. Я., Райдару Г. И., Яров Я. Л.,  
Шевченко В. П. \*, Мясоедов Н. Ф. \*

Тартуский государственный университет;

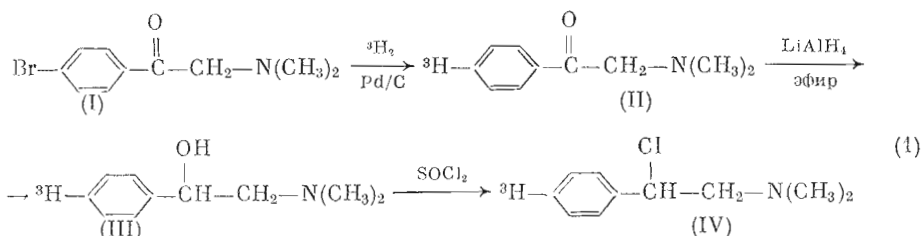
\* Институт молекулярной генетики Академии наук СССР, Москва

Описан синтез меченного тритием N,N-диметил-2-фенилазиридиния с молярной радиоактивностью 1,06 ТБк/ммоль. Изучена кинетика включения этого модификатора в ацетилхолинэстеразу яда кобры. Показано, что с одной молекулой фермента при pH 7,5 и 25° С реагируют две молекулы ингибитора. При этом первая молекула ингибитора связывается быстро ( $\tau_{1/2} = 4,8$  мин), не вызывая изменения активности фермента. Включение второй молекулы ингибитора в белок протекает медленнее ( $\tau_{1/2} = 6$  ч) и сопровождается симбатной инактивацией фермента. Молекулярная масса модифицированного фермента  $63 \pm 4$  кДа совпадает с молекулярной массой нативного фермента.

При взаимодействии ацетилхолинэстеразы (КФ 3.1.1.7) с солями азиридиния фермент полностью инактивируется по отношению к гидролизу специфических катионных субстратов [1, 2]. В то же время модифицированная таким образом ацетилхолинэстераза способна гидролизовать незаряженные субстраты [2-4]. Предполагают, что модифицирование ацетилхолинэстеразы азиридиниевыми ионами связано с алкилированием некой функционально важной группы молекулы белка, которая, вероятно, расположена в районе анионного центра фермента [1, 2]. Строение и физико-химические основы функционирования этого центра до сих пор не установлены. В связи с этим азиридиниевые ионы представляют интерес как аффинные метки, направленные в анионный центр холинэстераз. Определение скорости снижения активности фермента в ходе реакции с азиридиниевым ионом позволяет провести анализ кинетических закономерностей этого процесса [5, 6]. Однако этот подход не позволяет выявить строение модифицирующихся групп белка и определить стехиометрию реакции азиридиниевого иона с белком. Эти вопросы могут быть решены при применении меченного радиоактивным изотопом модификатора. Предварительным шагом в этом направлении является работа Белло и Ди Гуллио [7].

В настоящей работе был синтезирован высокомеченный тритием N,N-диметил-2-фенилазиридиний, использование которого позволило уточнить кинетические и стехиометрические закономерности реакции этого реагента с ацетилхолинэстеразой яда кобры и исследовать молекулярные свойства модифицированного белка.

Для синтеза меченного тритием N,N-диметил-2-хлор-2-фенилэтиламина (IV), который является исходным веществом при получении азиридиниевого ингибитора, была выбрана следующая схема:

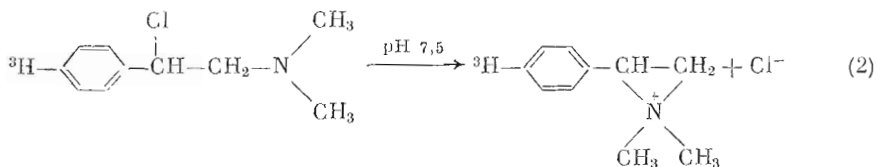


Выбор такой реакционной схемы позволил провести все этапы реакции при комнатной температуре, что обеспечило предотвращение разложения амина. Для восстановления  $\text{C}=\text{O}$ -группы в соединении (II)

использовался  $\text{LiAlH}_4$ , который является эффективным реагентом в случае стерически затрудненных кетонов, но может также участвовать в реакции дегалоидирования в ароматическом цикле [8]. По этой причине было целесообразно провести обмен атома брома на тритий в веществе (I) до обработки его алюмогидридом лития. Попытки применения для восстановления карбонильной группы кетона (I) боргидрида натрия, который считается более инертным при восстановлении ароматических галогенидов [8], в данном случае приводили к значительному дебромированию (I), тогда как карбонильная группа не восстанавливалась. Введение тритиевой метки непосредственно в 4-бромфенильный аналог вещества (IV) затруднено в связи с возможностью восстановительного дегалоидирования бензильного галоида [9].

Синтезированный по схеме 1 гидрохлорид  $N,N$ -диметил-2-хлор-2-[4'- $^3\text{H}$ ]фенилэтиламина имел молярную радиоактивность 1,06 ТБк/ммоль.

Полученное производное 2-хлорэтиламина при растворении в буфере с рН 7,5 спонтанно превращается в азиридиновое соединение:

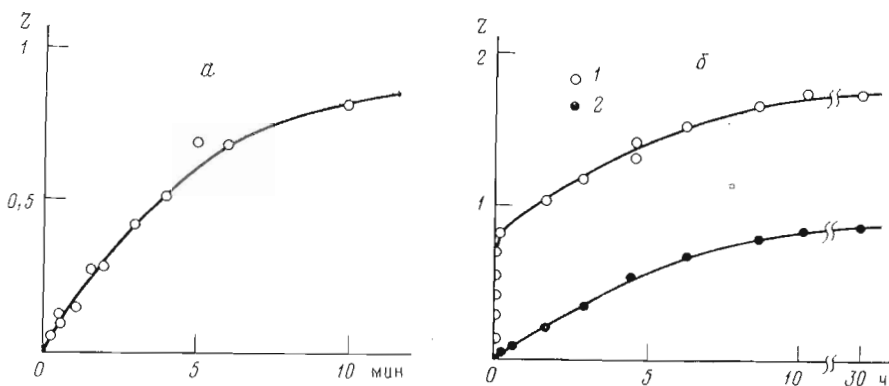


Этот процесс контролируют по изменению поглощения раствора при  $\lambda$  270 нм [10].

Полученная таким путем соль азиридиния является необратимым ингибитором ацетилхолинэстеразы [1, 3]. Реакцию ингибирования фермента описывают двухстадийной схемой [5, 6, 10, 11]:



где E — свободный фермент, I — азиридиновый ингибитор, EI — фермент-ингибиторный комплекс, EI\* — модифицированный фермент. Предполагают, что необратимая стадия (4) этого процесса — алкилирование молекулы белка азиридиновым соединением [1, 2]. В таком случае уменьшение активности фермента должно сопровождаться эквимольным включением ингибитора в молекулу белка. Однако в работе [7] показано, что с одной молекулой ацетилхолинэстеразы электрического органа электрического угря связываются в течение 13 ч (рН 7,0; 25°C) два остатка  $N,N$ -[ $^{14}\text{C}$ ]диметил-2-фенилазиридиния. В настоящей работе для ацетилхолинэстеразы яда кобры получено такое же конечное стехиометрическое соотношение фермента и азиридинового модификатора. Исследование кинетики включения в белок этих двух молекул лиганда показало, однако, что реакция азиридинового соединения с ферментом протекает в два этапа, которые резко различаются по скорости (рисунок). При этом включение в белок первой молекулы азиридинового соединения (рисунок а) не приводит к изменению активности фермента. Эта быстрая стадия характеризуется при концентрации соли азиридиния, равной 1,05 мМ, константой скорости  $k = (2,4 \pm 0,8) \cdot 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ . Последующий более медленный процесс присоединения второй молекулы азиридинового соединения к белку сопровождается инактивацией фермента (рисунок б, 2). При этом константы скорости реакции модификации ацетилхолинэстеразы в присутствии 1,05 мМ соли азиридиния, рассчитанные по данным включения радиоактивности в белок и по уменьшению активности фермента, имеют близкие значения:  $(3,2 \pm 1,2) \cdot 10^{-5}$  и  $(3,7 \pm 0,5) \cdot 10^{-5} \text{ с}^{-1}$  соответ-



Реакция ацетилхолинэстеразы с  $N,N$ -диметил-2-фенилазпиридином ( $[I]_0 = 1,05 \text{ мМ}$ ): *a* – начальный период реакции, *б* – конечный период реакции;  $Z$  – включение лиганда, моль/моль белка ( $I$ ), или степень инактивации фермента  $(v_0 - v_t)/v_0$ , где  $v_0$  и  $v_t$  – начальные скорости ферментативного гидролиза ацетилхолина в момент времени 0 и  $t$  (2)

венно. Такой результат подтверждает правомочность применения реакционной схемы 3–4 в кинетическом анализе, поскольку инактивация фермента связана с включением только одной молекулы лиганда в молекулу фермента.

Таким образом, с молекулой ацетилхолинэстеразы реагируют две молекулы азиридинового ингибитора. Образующиеся ковалентные связи между ферментом и молекулами модификатора стабильны при pH 7,5, так как инкубация меченого белка в реакционной среде в течение 100 ч не приводит к уменьшению связанной с белком радиоактивности. Стабильность модифицированного белка позволяла определить методом гель-фильтрации на Sephacryl S-300 его молекулярную массу. Оказалось, что и модифицированный белок, и нативная ацетилхолинэстераза элюируются одним симметричным пиком и в одинаковом объеме. Молекулярная масса  $63 \pm 4$  кДа, рассчитанная для этих белков, хорошо согласуется с известной из литературы величиной – 67 кДа [12]. Следовательно, ковалентная модификация ацетилхолинэстеразы яда кобры азиридиновыми ионами не приводит к отщеплению пептидных фрагментов от глобулы белка.

Полученные результаты показывают, что в молекуле ацетилхолинэстеразы существуют два пространственно разделенных центра, способных взаимодействовать с азиридиновым ингибитором. Участок связывания первой молекулы модификатора, очевидно, достаточно удален от каталитического центра, поскольку его модифицирование азиридиновым ионом не влияет на активность фермента. Вторая молекула модификатора, по-видимому, взаимодействует с белком в районе активного центра. Соответствующие участки, в которых реагируют эти две молекулы азиридинового иона, должны также различаться по химическому строению. Об этом свидетельствует разная скорость алкилирования этих центров. По имеющимся представлениям, алкилирование белка, как и спонтанный сольволиз азиридинового цикла, протекает по механизму  $S_N1$  [13]. Скорость этой реакции сильно зависит от сольватационных свойств реакционной среды и определяется главным образом общей основностью среды [6]. Следовательно, естественно предположить, что центр, в котором протекает быстрая реакция присоединения, отличается значительно большей основностью по сравнению со вторым центром модифицирования. Другие различия, в том числе специфичность обоих центров по отношению к одно- и двухзаряженным аммониевым ингибиторам, будут рассмотрены в следующих работах.

## Экспериментальная часть

УФ-спектры снимали на приборах Hitachi 420 (Япония) и Perkin — Elmer 402 (Англия), спектры  $^{13}\text{C}$ -ЯМР — на спектрометре Bruker AM-500 (ФРГ) при частоте 125,76 МГц. Радиоактивность определяли на сцинтилляционном счетчике LS 7500 (Beckman, США) со сцинтиллятором Quickszint 2000 (Zinsser Analytic, ФРГ). Для ТСХ использовали пластинки Silufol UV<sub>254</sub> (ЧССР). При разделении радиоактивных веществ хроматограммы анализировали на приборе LB 2832 Berthold Automatic TLC — Linear Analyzer (США).

Синтез и свойства немеченого гидрохлорида *N,N*-диметил-2-фенилэтиламина описаны в предыдущей работе [10].

*4*-Бромфенилметилкетон получали бромированием *4*-бромацетофенола (Союзреактив) по описанной методике [14]. Выход 77,6%, т.пл. 110–111°С.

Гидрохлорид *4*-бромфенил-(*N,N*-диметиламино)метилкетона (I) получали из *4*-бромфенилметилкетона по методике [12]. Выход 76%, т.пл. 204–206°С (разл.) УФ (этанол):  $\lambda_{\text{макс}}$  263 нм ( $\epsilon$  15 300). Спектр  $^{13}\text{C}$ -ЯМР ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ , м.д.: 44,9 ( $-\text{CH}_3$ ); 63,7 ( $-\text{CH}_2-$ ); 191,5 ( $\text{C}=\text{O}$ ); 133,8 ( $1'-\text{C}$ ); 131,0 ( $2'-\text{C}$ ); 133,5 ( $3'-\text{C}$ ); 130,9 ( $4'-\text{C}$ ).

Гидрохлорид (*N,N*-диметиламино)метил[ $4\text{-}^3\text{H}$ ]фенилкетона (II) получали катализическим дегалондированием соединения (I) газообразным тритием по методике [15], исходя из 11 мг гидрохлорида (I); давление трития 300 мм рт.ст., количество катализатора (10% Pd/C, Merck, ФРГ) 35 мг. Реакцию проводили при перемешивании в смеси хлороформ — этанол (8 : 2) при 20°С в течение 1,5 ч. Радиохимическую чистоту продукта проверяли методом ТСХ в системе этанол — уксусная кислота — вода (4 : 1 : 1), *R<sub>f</sub>* 0,29.

Гидрохлорид *N,N*-диметил-2-[ $4\text{-}^3\text{H}$ ]фенил-2-хлорэтиламина (IV) получали восстановлением кетона (II)  $\text{LiAlH}_4$  и последующим хлорированием полученного спирта (III) тионилхлоридом. Первую стадию проводили в абсолютном эфире при 20°С. Время реакции 15 мин. Избыток  $\text{LiAlH}_4$  разлагали водой при охлаждении, продукт (III) экстрагировали эфиром. Эфирный экстракт сушили над  $\text{MgSO}_4$ , фильтровали, упаривали, к остатку добавляли тионилхлорид (0,2 мл), смесь выдерживали 15 мин при 20°С, избыток реагента отгоняли в вакууме. К остатку (3,4 мг вещества) добавляли абсолютный этанол до удельной радиоактивности 37 МБк/мм, полученный раствор хранили при  $-25^\circ\text{C}$ . Методом ТСХ показано, что продукт является радиохимически индивидуальным веществом, который по хроматографическому поведению идентичен немеченому гидрохлориду *N,N*-диметил-2-хлор-2-фенилэтиламина (*R<sub>f</sub>* 0,44, этанол — уксусная кислота — вода, 4 : 1 : 1). УФ-спектр (этанол),  $\lambda_{\text{макс}}$ , нм: 253, 259, 265; для нерадиоактивного стандартного вещества  $\lambda_{\text{макс}}$  253 ( $\epsilon$  190), 259 ( $\epsilon$  240), 265 нм ( $\epsilon$  246). Молярная радиоактивность 1,06 ТБк/ммоль. Для проведения кинетических экспериментов полученное радиоактивное вещество разбавляли до 10 раз немеченым соединением.

Растворы *N,N*-диметил-2-фенилазиридиния получали непосредственно перед экспериментами растворением необходимого количества гидрохлорида *N,N*-диметил-2-хлор-2-фенилэтиламина в фосфатном буфере с pH 7,5. При 25°С циклизация 2-хлорэтиламиногруппы протекает с временем полупревращения 12 с [10]. В случае радиоактивного препарата, который хранили растворенным в этаноле, перед добавлением буфера отгоняли растворитель.

Ацетилхолинэстеразу из ядра среднеазнатской кобры (*Naja naja oxiana*) очищали методом аффинной хроматографии как описано в работе [12]. Гомогенность препарата проверяли электрофорезом в 7,5% ПААГ. Препарат фермента хранили при 4°С в виде раствора в 0,15 М KCl, концентрация активных центров 0,8–1 мкМ. Для титрования фермента методом Берри использовали *O,O*-диэтил-*n*-нитрофенилфосфат. Методика и реагенты для титрования описаны в работе [16].

За кинетикой реакции модификации ацетилхолинэстеразы следили по уменьшению активности фермента в реакции с ацетилтихолином как описано раньше [6] и по включению радиоактивной метки в белок. В последнем случае реакцию останавливали добавлением тиосульфата натрия (20 мМ) в реакционную смесь, что обеспечивает быстрое разложение азиридинового ингибитора [13]. Отделение меченой тритиевой меткой ацетилхолинэстеразы от низкомолекулярных компонентов реакционной смеси проводили на колонках Sephadex G50 (1,1×25 см) в 0,1 М фосфатном буфере, pH 7,5, со скоростью 1 мл/мин. В этих условиях белковые компоненты элюируются в течение 6–8 мин. Быстрота процесса разделения допускала проведение опытов при комнатной температуре. Фракции собирали по каплям в скитилляционные кюветы и определяли радиоактивность проб. Общее количество радиоактивного вещества в пике рассчитывали суммированием.

Молекулярную массу нативной ацетилхолинэстеразы и меченого радиоактивным азиридиновым ингибитором белка определяли на колонке Sephacryl S-300 (1,6×90 см), элюент — 0,1 М фосфатный буфер, 0,5 М NaCl, pH 7,4. Для калибровки колоночки использовали комплект стандартных белков фирм Pharmacia (Швеция) и Serva (ФРГ): цитохром с, яичный альбумин, сывороточный альбумин и каталазу. Для колоночной хроматографии использовали оборудование фирмы ЛКВ (Швеция) (2132 перистальтический насос, 2137 хроматографические колонки, 2138 Uvicord S, 2112 коллектор фракции Redi Rac).

Авторы выражают благодарность Т. Вялимяе за снятие и интерпретацию ЯМР-спектров и Р. Раба за предоставление препарата фермента.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Belleau B., Tani H. *Mol. Pharmacol.*, 1966, v. 2, № 5, p. 411–422.
2. O'Brien R. D. *Biochem. J.*, 1969, v. 113, p. 713–719.
3. Purdie J. E., McIvor R. A. *Biochim. et biophys. acta*, 1966, v. 128, p. 590–593.
4. Purdie J. E. *Biochim. et biophys. acta*, 1969, v. 185, p. 122–133.
5. Purdie J. E., Heggie R. M. *Can. J. Biochem.*, 1970, v. 48, № 3, p. 244–250.
6. Палумма П. Я., Клямбре Т. Х., Ярв Я. Л. *Биоорг. химия*, 1983, т. 9, № 10, с. 1348–1355.
7. Belleau B., Di Tullio V. *Can. J. Biochem.*, 1971, v. 49, № 10, p. 1131–1133.
8. Hajós A. *Complex Hydrides*. Budapest: Akad. Kiadó, 1979, p. 46–58, 121–124.
9. *Methoden der organischen Chemie* (Houben-Weyl). B. IV/1c Reduction. Teil I/Hrsg. Kropf H. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 1980, S. 364–374.
10. Palumaa P., Mähar A., Järv J. *Bioorgan. Chem.*, 1982, v. 11, № 4, p. 394–403.
11. Волкова Р. И., Кочерова Л. М. *Биоорг. химия*, 1977, т. 3, № 11, с. 1539–1552.
12. Raba B., Aaviksaar A., Sügur J. *Eur. J. Biochem.*, 1979, v. 96, p. 151–158.
13. Chapman N. B., Triggie D. I. *J. Chem. Soc.*, 1963, v. 265, p. 1385–1400.
14. *Organikum. Organisch-Chemisches. Grundpraktikum 12*. Auflage/Becker H., Berger W. u. a. Berlin: Deutscher Verlag der Wissenschaften, 1973, S. 532–533.
15. Brown G. B., Tieszen S. C., Daly J. W., Warnick J. E., Albuquerque E. X. *Cell. Mol. Neurobiol.*, 1981, v. 1, № 1, p. 19–40.
16. Ярв Я. Л., Аавиксаар А. А., Годовиков Н. Н., Лангель Ю. Л., Паст У. Э. *Биохимия*, 1976, т. 41, № 5, с. S27–S35.

Поступила в редакцию  
18.IV.1985

#### SYNTHESIS OF TRITIUM LABELED N,N-DIMETHYL-2-PHENYLAZIRIDIUM AND ITS REACTION WITH ACETYLCHOLINESTERASE

PALUMAA P. J., RAIDARU G. I., JÄRV J. L., SCHEVCHENKO V. P. \*,  
MYASOYEDOV N. P. \*

Tartu State University, Tartu; \*Institute of Molecular Genetics,  
Academy of Sciences of the USSR, Moscow

The synthesis of tritium-labeled N,N-demethyl-2-phenylaziridinium has been described. The specific radioactivity of the product obtained was 1,06 TBq/mole. Kinetics of incorporation of this radioactive label into acetylcholinesterase of cobra venom (*Naja naja oxiana*) has been studied at 1,05 mM ligand concentration (25° C, pH 7.50, 0,15 M phosphate buffer). Under these conditions two molecules of the radioactive label have been found to react with the enzyme. One molecule incorporates fast with half-life of 4,8 min, not affecting the enzymatic activity. Incorporation of the second label is a slow reaction with half-life of 6 hr and leads to complete inactivation of acetylcholinesterase. Molecular mass of the modified enzyme is 63±4 kDa and coincides with that of native one.