



УДК 577.152.311\*7.042

## УСКОРЕНИЕ АЛКИЛБОРНЫМИ КИСЛОТАМИ РЕАКЦИИ АЛКИЛИРОВАНИЯ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ ИОНОМ N, N-ДИМЕТИЛ-2-ФЕНИЛАЗИРИДИНИЯ

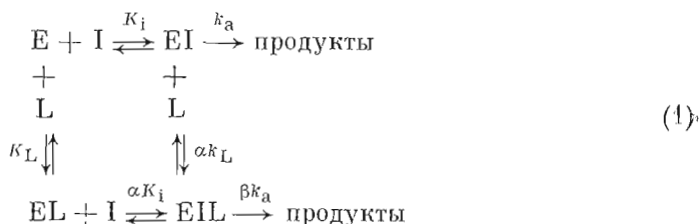
*Палуша П. Я., Яров Я. Л.*

*Тартуский государственный университет*

Изучена кинетика алкилирования ацетилхолинэстеразы ионом N,N-диметил-2-фенилазиридилия в присутствии ряда *n*-алкилборных кислот  $\text{H}(\text{CH}_2)_n\text{B}(\text{OH})_2$  ( $n=1$  и 4–8). Влияние *n*-пропилборной кислоты на эту реакцию было исследовано раньше. Показано, что все изученные *n*-алкилборные кислоты образуют с ферментом и азиридилиевым ионом тройной комплекс. Эффективность связывания лигандов с ферментом в этом комплексе уменьшается, что указывает на взаимодействие между соответствующими центрами связывания. Вместе с тем при образовании тройного комплекса увеличивается скорость реакции алкилирования фермента азиридилиевым ионом. Метилборная кислота не влияет на эффективность связывания азиридилиевого иона и не ускоряет реакцию алкилирования, тогда как в ряду *n*-алкилборных кислот с  $n=3-8$  эффект ускорения уменьшается при увеличении длины алкильного радикала.

Обнаруженный эффект свидетельствует о том, что в присутствии алкилборных кислот в сольватационных свойствах окружающей азиридилиевый ион среды происходят значительные изменения, являющиеся, вероятно, результатом конформационных перестроек активного центра фермента в процессе образования тройного комплекса.

Ионы N,N-диметил-2-фенилазиридилия связываются в активном центре ацетилхолинэстеразы (КФ 3.1.1.7) и алкилируют некую группу молекулы белка [1, 2]. Такая модификация фермента приводит к его полной инактивации в реакции с холиновыми субстратами [3]. В присутствии алкилборных кислот в реакционной среде скорость алкилирования фермента увеличивается [4], при этом образуется тройной комплекс EIL согласно схеме



где E — фермент, I — азиридилиевый ион, L — алкилборная кислота. При анализе схемы (1) для случая с использованием *n*-пропилборной кислоты было установлено [4], что эффект ускорения обусловлен повышением скорости на стадии образования алкильного производного фермента ( $\beta=85$ ), в то время как образование комплекса фермент–азиридилиевый ион даже затруднено в присутствии пропилбората ( $\alpha=6$ ).

С целью дальнейшего изучения механизма эффекта ускорения алкилирования ацетилхолинэстеразы в настоящей работе изучали зависимость величин  $\alpha$  и  $\beta$  от строения *n*-алкилборных кислот  $\text{H}(\text{CH}_2)_n\text{B}(\text{OH})_2$  при  $n=1$  и 4–8.

Реакция алкилирования ацетилхолинэстеразы в присутствии *n*-алкилборных кислот с  $n>1$  хорошо описывается уравнением кинетики реакции первого порядка (рис. 1), что позволяет рассчитать константы скорости этой реакции  $k_{\text{набл}}$  при разных начальных концентрациях обоих реагентов (табл. 1). В случае метилборной кислоты ускорения не обнаруживали,

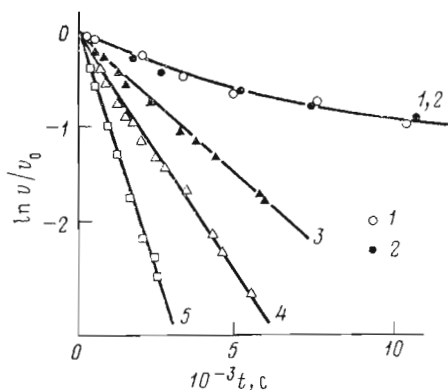


Рис. 1

Рис. 1. Алкилирование ацетилхолинэстеразы  $N,N$ -диметил-2-фенилазиридиниевым ионом ( $[I]_0 = 5 \cdot 10^{-4}$  М) в отсутствие алкилборных кислот (1) и в присутствии 0,146 мМ метилборной кислоты (2), 0,54 мМ гептилборной кислоты (3), 1,12 мМ гексилборной кислоты (4) и 1,96 мМ амилборной кислоты (5)

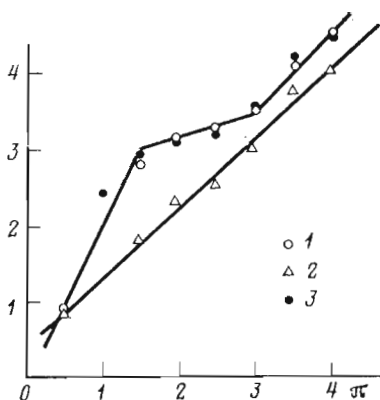


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость констант  $pK_L$  (1),  $p(\alpha K_L)$  (2) и  $pK_i$  [6] (3) от константы гидрофобности  $\pi$  алкильного радикала  $n$ -алкилборных кислот  $H(CH_2)_nB(OH)_2$

Рис. 3. Зависимость  $1/\alpha$  от  $n$  для связывания  $n$ -алкилборных кислот  $H(CH_2)_nB(OH)_2$  и аммониевых ингибиторов с активным центром ацетилхолинэстеразы: 1 —  $N,N$ -диметил-2-фенилазиридиниевый ион, 2 — тетраметиламмониевый ион (данные работы [6])

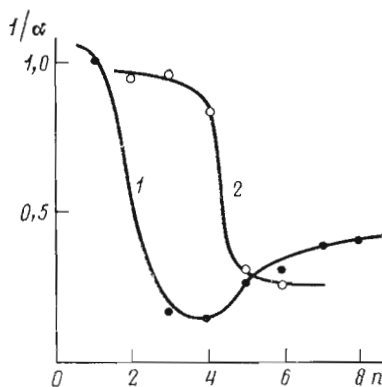


Рис. 3

хотя в опытах использовали концентрации лиганда вплоть до 0,146 М, превышающие значение  $K_i = 0,120 \pm 0,06$  М. Последняя величина определена из опытов по ингибированию метилборной кислотой ацетилхолинэстеразы в реакции гидролиза ацетилтихолина (0,1 М фосфатный буфер, рН 7,5; 25° С).

При обработке кинетических данных исходили из реакционной схемы (1), которой соответствует [3] уравнение (2):

$$k_{\text{набл}} = \frac{k_a + \beta k_a \frac{[L]}{\alpha K_L}}{1 + \frac{K_i}{[I]} + \frac{K_i [I]}{K_L [I]} + \frac{[L]}{K_L}} \quad (2)$$

Константы  $K_i$  и  $k_a$  в этом уравнении характеризуют взаимодействие азиридиниевого иона с ферментом и не зависят от природы второго лиганда. Поэтому при обработке данных использовали ранее найденные значения этих констант  $k_a = 7,0 \cdot 10^{-5}$  с $^{-1}$  и  $K_i = 2,0 \cdot 10^{-5}$  М [5]. Это позволило рассчитать по данным табл. 1 параметры  $K_L$ ,  $\alpha$  и  $\beta$ , используя программу нелинейных наименьших квадратов. По этим результатам можно также рассчитать значения  $1/\alpha \cdot K_L$ , которые характеризуют взаимодействие  $n$ -алкилборных кислот с фермент-ингибиторным комплексом EI. Результаты обработки данных табл. 1 по уравнению (2) приведены в табл. 2.

Найденные по данным кинетики алкилирования ацетилхолинэстеразы значения  $K_L$  хорошо согласуются с результатами ингибиторного анализа, полученными в работе [6]. Дополнение этих ранее опубликованных результатов константой ингибирования для метилборной кислоты позволяет уточнить характер зависимости степени ингибирования от гидрофобности

Зависимость константы скорости реакции алкилирования  
ацетилхолинэстеразы ионом N,N-диметил-2-фенилазиридиния (I)  
от концентрации алкилборных кислот  
0,1 М фосфатный буфер (рН 7,5), 25° С

[I] · 10 <sup>4</sup> , М	$k_{\text{набл}} \cdot 10^4, \text{с}^{-1}$			
	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> B(OH) <sub>2</sub> , мм			
	0,18	0,60	1,8	3,6
0,55	—	2,05±0,25	4,60±0,50	7,03±0,16
1,08	—	2,43±0,15	6,00±0,40	9,43±0,57
1,66	1,90±0,15	3,01±0,38	7,01±0,53	10,5±0,9
4,12	2,00±0,30	3,48±0,30	9,00±0,52	12,5±1,2
9,82	2,03±0,12	4,23±0,32	10,5±0,7	13,7±1,2
C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> B(OH) <sub>2</sub> , мм				
	0,327	0,653	1,96	3,92
0,10	—	1,78±0,13	2,16±0,15	2,21±0,12
0,20	2,05±0,69	2,05±0,67	2,95±0,17	2,92±0,15
0,50	2,22±0,15	3,17±0,15	6,41±0,57	6,67±0,58
1,0	2,42±0,17	3,75±0,40	7,53±0,25	9,09±0,42
1,5	2,68±0,10	3,85±0,22	7,68±0,42	8,75±0,93
4,9	2,58±0,13	4,08±0,20	8,43±0,92	10,3±1,3
9,66	2,5±0,17	4,27±0,20	8,61±0,48	10,0±1,1
C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> B(OH) <sub>2</sub> , мм				
	0,224	0,45	1,12	2,24
0,15	—	—	1,95±0,15	2,32±0,18
0,30	1,67±0,12	2,30±0,13	3,00±0,27	3,43±0,47
0,80	2,05±0,10	3,33±0,23	4,20±0,25	5,03±0,38
2,0	2,60±0,18	4,18±0,13	5,83±0,60	7,50±0,53
5,0	2,83±0,32	4,38±0,42	6,17±0,47	8,05±0,55
C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> B(OH) <sub>2</sub> , мм				
	0,108	0,216	0,540	1,08
0,6	—	1,68±0,13	2,0±0,13	2,42±0,33
1,0	2,08±0,07	2,50±0,18	3,00±0,17	3,58±0,37
2,0	3,05±0,40	3,57±0,42	4,42±0,27	5,08±0,42
5,0	3,62±0,37	4,40±0,33	5,32±0,48	5,63±0,38
10,0	3,57±0,28	4,50±0,47	5,37±0,33	5,78±0,23
C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> B(OH) <sub>2</sub> , мм				
	0,103	0,207	0,516	
1,0	—	1,42±0,15	1,76±0,23	
2,0	1,48±0,13	1,85±0,20	2,12±0,13	
5,0	1,53±0,10	1,82±0,13	2,15±0,11	

углеводородного заместителя *n*-алкилборных кислот. В этой зависимости четко выделяются три участка (рис. 2), которые могут быть описаны прямыми согласно корреляционному уравнению

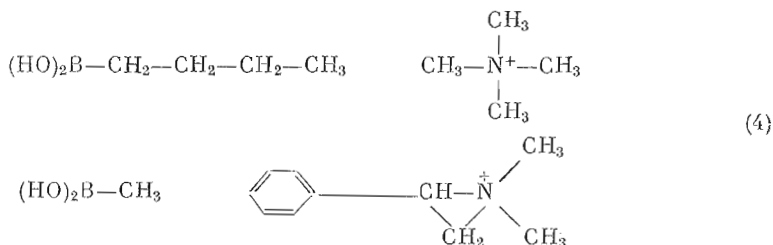
$$pK_L = pK_L^0 + \pi \phi, \quad (3)$$

где  $\pi$  — константа гидрофобности заместителя R в  $RB(OH)_2$  [7],  $\phi$  — фактор интенсивности гидрофобного влияния. Для первой части зависимости  $pK_L$  от  $\pi$ , т. е. для соединений с  $n=1-3$ , получили  $\phi=1,8$ . При переходе к *n*-бутилборной кислоте резко меняется механизм взаимодействия, и в случае ингибиторов  $H(CN_2)_nB(OH)_2$  с  $n=4-6$  гидрофобность алкильной группы практически не оказывает влияния на эффективность связывания. При  $n \geq 6$   $\phi=0,99$ ; следовательно, алкильные группы достигают некоторой новой гидрофобной области.

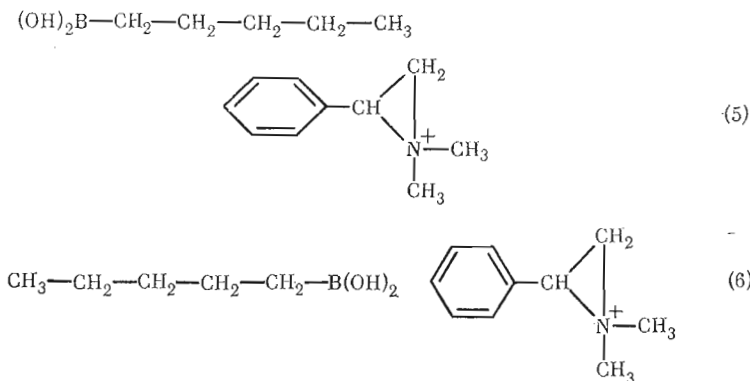
Поскольку боратные группы всех *n*-алкилборных кислот, вероятно, одинаково связаны в эстеразном центре фермента, можно предположить, что зависимость  $pK_L$  от  $\pi$  отражает связывающие свойства некоторой

определенной гидрофобной области активного центра. Отсутствие гидрофобного эффекта для алкилборных кислот с  $n=4-6$  можно объяснить локализацией на этом месте активной поверхности так называемого «анионного» центра [6].

Коэффициент  $\alpha$  в реакционной схеме (1) характеризует степень взаимозависимости связывания лигандов I и L с активным центром фермента. Тот факт, что метилборная кислота не влияет на связывание азиридиниевого иона, согласуется с представлением о пространственной разделенности эстеразного и анионного центров, а также об отсутствии кооперативной связи между их свойствами. В случае же остальных  $n$ -алкилборных кислот  $1/\alpha < 1$  и связывание одного лиганда мешает связыванию второго лиганда. Аналогичная зависимость  $1/\alpha$  от длины углеводородного радикала  $n$ -алкилборных кислот была раньше исследована для случая взаимодействия ацетилхолинэстеразы с тетраметиламмониевым ионом как направленным в анионный центр ингибитором [6]. В последнем случае  $1/\alpha$  стала ниже единицы при переходе от  $n$ -бутилборной кислоты к  $n$ -амилборной кислоте (рис. 3). Эту разницу в зависимости  $1/\alpha$  от  $n$  для тетраметиламмониевого и  $N,N$ -диметил-2-фенилазиридиниевого ионов можно в первом приближении объяснить неодинаковыми размерами этих ингибиторов, как иллюстрировано на схеме



В то же время обращает на себя внимание тот факт, что тройные комплексы образуются и в случае больших лигандов — коэффициент  $1/\alpha$  не становится равным нулю до  $n=8$  (рис. 3). Следовательно, либо перекрытие участков для связывания I и L не является критическим для образования тройного комплекса EIL (схема 5), либо необходимо предположить существование некоторой альтернативной гидрофобной области для связывания углеводородного заместителя алкилборных кислот (схема 6):



Связывающие свойства гидрофобного центра, с которым взаимодействует углеводородный радикал алкилборных кислот в тройном комплексе EIL, характеризуются параметром  $\alpha K_L$ . На рис. 2 приведена зависимость  $\rho(\alpha K_L)$  от  $\pi$ . Для всех изученных соединений получается единая линейная зависимость с  $\varphi=0,92 \pm 0,14$ ,  $\rho(\alpha K_L^0)=0,45 \pm 0,36$ . Следовательно, в этом случае  $n$ -алкильные группы связываются с однородной гидрофобной поверхностью. Такое изменение «наблюдаемой топографии» гидрофобной области, однако, не является достаточным аргументом в пользу приведенной на схеме (6) модели, поскольку не исключена возможность,

Влияние алкилборных кислот R – В(ОН)<sub>2</sub> на кинетические параметры реакции N,N-диметил-2-фенилазиридиния с ацетилхолинэстеразой

R	K <sub>L</sub> , М	α	β
CH <sub>3</sub>	(1,2±0,6) · 10 <sup>-1</sup> *	1	1
C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> **	(2,2±1,0) · 10 <sup>-3</sup>	6,0±2,0	85±29
C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	(5,75±0,59) · 10 <sup>-4</sup>	7,4±2,0	46±4
C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	(7,60±0,69) · 10 <sup>-4</sup>	3,41±0,32	21,5±1,3
C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>	(2,84±0,07) · 10 <sup>-4</sup>	3,26±0,98	17,2±4,2
C <sub>7</sub> H <sub>15</sub>	(4,90±0,10) · 10 <sup>-5</sup>	2,44±0,32	10,5±1,1
C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>	(3,16±2,8) · 10 <sup>-5</sup>	2,53±1,20	3,48±0,80

\* По данным ингибирования гидролиза ацетилтихолина (0,1 М фосфатный буфер, pH 7,5; 25° С).

\*\* Данные из работы [4].

что связывание азиридиниевого ингибитора существенно изменяет связывающие свойства гидрофобного участка.

Количественной мерой эффекта ускорения алкилирования ацетилхолинэстеразы является константа β, также зависящая от строения *n*-алкилборных кислот (табл. 2). В рамках изученной реакционной серии алкилирование максимально ускоряется *n*-пропилборной кислотой. Дальнейшее увеличение длины *n*-алкильного заместителя приводит к уменьшению величины β. Из этой закономерности выпадает только метилборная кислота, в случае которой эффект ускорения отсутствует, но, как было показано выше, метильная группа метилбората также не влияет на связывание азиридиниевого ингибитора с ферментом (α=1).

Согласно имеющимся представлениям, реакция разложения азиридиниевого иона протекает через образование карбониевого иона в скорость-лимитирующей стадии [8]. По данным кинетики спонтанного сольволиза, скорость разложения иона N,N-диметил-2-фенилазиридиния определяется основностью реакционной среды [5]. Следовательно, естественно предположить, что связывание алкилборных кислот с ферментом меняет именно этот фактор в центре связывания азиридиниевого иона. Ранее было высказано предположение о двух гипотетических механизмах для объяснения эффекта ускорения реакции алкилирования белка [4].

Во-первых, можно представить, что связывание алкилборной кислоты в активном центре фермента приводит к некоторой конформационной перестройке белка, в результате чего в районе связывания азиридиниевого иона проявляется дополнительная основная группа, взаимодействие которой с ионом азиридиния ускоряет его разложение и реакцию алкилирования.

Во-вторых, связывание алкилборной кислоты в активном центре фермента может сопровождаться вытеснением локализованных там молекул воды. Такая «дегидратация» активной поверхности может повышать эффективную концентрацию (доступность) основных групп белка и тем самым ускорять реакцию алкилирования [4].

Полученные в настоящей работе данные показывают, что предположительно изменение основности в активном центре фермента зависит от строения углеводородного заместителя алкилборных кислот. При этом начиная с *n*-пропилборной кислоты коэффициент β регулярно уменьшается по мере увеличения *n*. Такую зависимость невозможно объяснить, исходя из представления об одинаковом для всех алкилборных кислот конформационном переходе, в результате которого в районе активного центра появляется новая основная группа. С другой стороны, также трудно понять, почему степень «дегидратации» активной поверхности ацетилхолинэстеразы уменьшается по мере увеличения длины (и объема) углеводородного заместителя алкилборных кислот. Таким образом, оба вышеприведенных гипотетических механизма не способны без введения дополнительных предположений объяснить зависимость степени ускорения реакции алки-

лирования ацетилхолинэстеразы ( $\beta$ ) от размера углеводородного радикала в молекуле алкилборной кислоты ( $n$ ). Дальнейшее обсуждение и анализ возможных конформационно-сolvатационных перестроек активного центра фермента требует привлечения дополнительных экспериментальных данных, например о температурной зависимости процессов комплексообразования и эффекта ускорения алкилборными кислотами алкилирования ацетилхолинэстераз азиридиновым ионом.

### Экспериментальная часть

Ацетилхолинэстеразу из яда кобры (*Naja naja oxiana*) очищали как описано в работе [9], исключая стадию аффинной хроматографии. Раствор фермента готовили в 0,15 М растворе KCl, концентрацию активных центров фермента определяли согласно [10]. Раствор N,N-диметил-2-фенилазиридиния готовили непосредственно перед опытом растворением в реакционной среде (0,1 М фосфатный буфер, pH 7,5; 25°С) необходимой навески гидрохлорида N,N-диметил-2-хлор-2-фенилэтиламина, при этом в течение 1–2 мин образуется азиридиновый ингибитор. Более детальное описание этой процедуры и синтез исходного вещества опубликованы раньше [11]. Синтез и свойства  $n$ -алкилборных кислот описаны в работе [12].

Ингибиторные свойства метилборной кислоты определяли соответственно работе [6]. Реакцию алкилирования фермента проводили в 0,1 М фосфатном буфере при pH 7,5 и 25°С. В случае гексил-, гептил- и октилборной кислот реакционная среда содержала до 3% этанола. Из реакционной смеси, содержащей фермент и разные концентрации азиридинового ингибитора и алкилборных кислот, отбирали в определенные моменты времени пробы. После разбавления проб в 300 раз в них определяли остаточную активность фермента, используя спектрофотометрическую методику Элманна и др. [13]. Более детальное описание метода кинетических измерений дано в работах [3, 6, 11]. Измерения проводили на спектрофотометре Perkin — Elmer 402, обработку данных и их статистическую обработку осуществляли на ЭВМ «Искра 1256» и «Наира 3-2».

Авторы выражают благодарность Т. В. Ротановой за предоставление препаратов алкилборных кислот и за полезные замечания, сделанные в ходе этой работы.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Belleau B., Tani H. Mol. Pharmacol., 1962, v. 2, p. 411–422.
2. Belleau B., Di Tullio V. Can. J. Biochem., 1971, v. 49, № 10, p. 1131–1133.
3. Purdie J. E. Biochim. et biophys. acta, 1969, v. 185, p. 122–133.
4. Palumaa P., Järv J. Biochim. et biophys. acta, 1984, v. 784, p. 35–39.
5. Палумаа П. Я., Кязмбре Т. Х., Ярв Я. Л. Биооргани. химия, 1983, т. 9, № 10, с. 1348–1355.
6. Ярв Я. Л., Спэкк М. А., Лангель Ю. Л., Ротанова Т. В. Биооргани. химия, 1978, т. 4, № 10, с. 1364–1371.
7. Hansch C., Leo A. Substituent constants for correlation analysis in chemistry and biology, appendix. N. Y.: John Wiley and Sons, 1979.
8. Chapman N. B., Triggler D. J. J. Chem. Soc., 1963, v. 256, p. 1385–1400.
9. Raba R., Aaviksaar A., Raba M., Siigur J. Eur. J. Biochem., 1979, v. 96, p. 151–158.
10. Ярв Я. Л., Аавиксаар А. А., Годовиков Н. Н., Лангель Ю. Л., Паст У. Э. Биохимия, 1976, т. 41, с. 827–835.
11. Palumaa P., Mähar A., Järv J. Bioorgan. Chem., 1982, v. 11, p. 394–403.
12. Антонов В. К., Иванова Т. В., Березин И. В., Мартинек К. Молекулярн. биология, 1970, т. 4, № 4, с. 558–569.
13. Ellmann G. L., Courtney K. D., Andres Jr. V., Featherstone R. M. Biochem. Pharmacol., 1961, v. 7, p. 88–95.

Поступила в редакцию  
18.III.1985.

ALKYLBORONIC ACID ACCELERATION OF ACETYLCHOLINESTERASE  
ALKYLATION WITH N,N-DIMETHYL-2-PHENYLAZIRIDIUM ION

PALUMAA P. J., JÄRV J. L.

*Tartu State University, Tartu*

The kinetics of acetylcholinesterase alkylation with N,N-dimethyl-2-phenylaziridinium ion has been studied in the presence of *n*-alkylboronic acids  $\text{H}(\text{CH}_2)_n\text{B}(\text{OH})_2$  ( $n=1$  and 4-8). All studied *n*-alkylboronic acids give a ternary complex with the enzyme and aziridinium ion. The efficacy of ligand binding is lower in such a complex, thus pointing to the interaction between the respective binding sites. However, the ternary complex formation is accompanied by an increase in the reaction rate of the enzyme alkylation by an aziridinium ion. Methylboronic acid affects neither binding efficacy of the aziridinium ion, nor the alkylation rate, whereas in the series of alkylboronic acids with  $n=3-8$  the accelerating effect diminishes with the lengthening of alkyl chain. These findings are indicative of considerable changes in the solvation properties of the medium around the aziridinium ion associated with the presence of alkylboronic acids. Such alterations might be induced by conformational rearrangements in the enzyme active site in the course of the ternary complex formation.