



УДК 577.153.02

МЕХАНИЗМ РЕАКЦИИ N,N-ДИМЕТИЛ-2-ФЕНИЛАЗИРИДИНИЯ
С АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗОЙ В ЕЕ АКТИВНОМ ЦЕНТРЕ

Сооетте У. В., Палуаа П. Я., Ярв Я. Л.

Тартуский государственный университет

Изучено влияние температуры на скорость реакции модификации ацетилхолинэстеразы ионом N,N-диметил-2-фенилазиридиния, приводящей к необратимому ингибированию катализируемого ферментом гидролиза катионных субстратов. Получены следующие значения энтальпии и энтропии: $\Delta H^\ddagger = 94$ кДж/моль, $\Delta S^\ddagger (25^\circ \text{C}) = -9,4$ Дж/моль·град. Сравнением этих результатов с известными данными по температурной зависимости сольволиза N,N-диметил-2-фенилазиридиниевого иона показано, что реакция взаимодействия с белком протекает по механизму нуклеофильного замещения S_N1 . Полученные результаты открывают возможность применения азиридиниевого иона в качестве «химического зонда» для исследования сольватационных свойств активного центра фермента. Показано, что при взаимодействии ацетилхолинэстеразы с азиридиниевым ионом образуется гидролизуемая связь. Кинетика спонтанного гидролиза этой связи свидетельствует о том, что в активном центре модифицирован только один аминокислотный остаток — по-видимому, некая карбоксильная группа, расположенная в районе так называемого аннионного центра ацетилхолинэстеразы.

Взаимодействие азиридиниевых соединений с холинэстеразами приводит к модификации каталитической активности ферментов [1–3], что объясняют алкилированием некоторых нуклеофильных остатков этих белков [4]. Можно предположить два разных механизма реакции азиридиниевых соединений с нуклеофильными реагентами [5]: 1) нуклеофильное замещение первого порядка S_N1 через образование карбониевого иона на скоростьопределяющей стадии; 2) нуклеофильное замещение второго порядка по механизму S_N2 . При сольволизе N,N-диметил-2-фенилазиридиния реализуются оба механизма в зависимости от природы нуклеофильного компонента реакции [6]. При этом для каждого механизма соблюдается собственная изокинетическая зависимость [6]. Это открывает реальную возможность определения механизма отдельно изучаемых реакций азиридиниевого иона путем проверки принадлежности соответствующих термодинамических параметров к ранее установленным изокинетическим зависимостям.

В данной работе такой подход использовали для установления механизма реакции N,N-диметил-2-фенилазиридиниевого иона с ацетилхолинэстеразой в ее активном центре. Для этой цели исследовалась температурная зависимость скорости алкилирования белка и полученные данные сопоставлялись с изокинетической зависимостью для реакций сольволиза того же азиридиниевого иона.

Известно, что с одной молекулой ацетилхолинэстеразы реагируют две молекулы азиридиниевого реагента [4, 7]. Присоединение первой молекулы азиридиниевого соединения к ферменту протекает быстро и не приводит к изменению каталитической активности ацетилхолинэстеразы [7]. В результате взаимодействия второго азиридиниевого иона с ферментом утрачивается активность ацетилхолинэстеразы в реакциях гидролиза катионных субстратов [7]. В настоящей работе за алкилированием ацетилхолинэстеразы следили по ингибированию гидролиза ацетилтиохолина, поэтому полученные данные относятся к реакции присоединения второй молекулы азиридиниевого соединения к молекуле белка. Кинетику этой

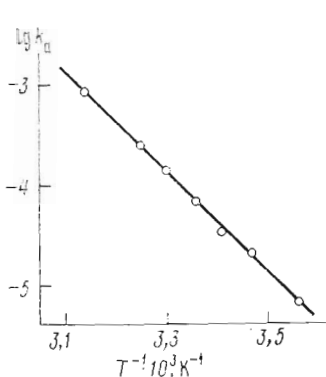


Рис. 1

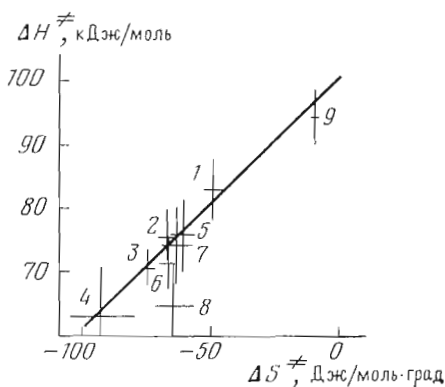


Рис. 2

Рис. 1. Влияние температуры на скорость реакции N,N -диметил-2-фенилазиридиния с ацетилхолинэстеразой

Рис. 2. Зависимость между энтальпией и энтропией активации для реакций сольволиза N,N -диметил-2-фенилазиридиниевого иона в воде (1), в водных растворах этилового спирта (концентрация 5,2 (2), 10,0 (3) и 13,9 (4)), диметилсульфоксида (концентрация 4,1 (5), 6,8 М (6)), диметилформамида (концентрация 5,0 М (7)) и в 1 М растворе КОН (8), а также для реакции алкилирования активного центра ацетилхолинэстеразы (9)

реакции анализировали с использованием реакционной схемы



как описано в работе [8]. Полученные при разных температурах значения k_a приведены в таблице. Из рис. 1 видно, что в интервале температур от 8 до 45° С эти результаты хорошо описываются линейной зависимостью в координатах уравнения Аррениуса:

$$\lg k_a = \lg k_a^0 - \frac{E_a}{2,303 RT}, \quad (2)$$

что позволяет сделать расчет термодинамических активационных параметров реакции модификации ацетилхолинэстеразы: $\Delta H^{\ddagger} = 94 \pm 4$ кДж/моль и $\Delta S^{\ddagger} (25^\circ \text{C}) = -9,4 \pm 2,2$ Дж/моль·град (расчет проводили как описано в работе [6]).

Обработку данных по температурной зависимости, полученных для реакций алкилирования фермента и сольволиза азиридиниевого иона, проводили двумя способами.

1. По классическому уравнению изохнетической зависимости в координатах ΔH^{\ddagger} , ΔS^{\ddagger} [9]:

$$\Delta H^{\ddagger} = A_1 + \beta \Delta S^{\ddagger}, \quad (3)$$

где β — изохнетическая температура для данной реакционной серии, A_1 —

Константы скорости реакции модифицирования ацетилхолинэстеразы ионом N,N -диметил-2-фенилазиридиния при различных температурах (0,15 М фосфатный буфер, рН 7,5)

Температура, °С	$k_a \cdot 10^4$, с ⁻¹	Температура, °С	$k_a \cdot 10^4$, с ⁻¹
8	0,07 ± 0,03	30	1,49 ± 0,03
15,5	0,21 ± 0,01	35	2,57 ± 0,16
20	0,35 ± 0,05	45	8,75 ± 0,28
25	0,77 ± 0,06		

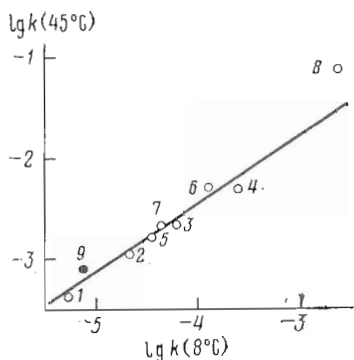


Рис. 3

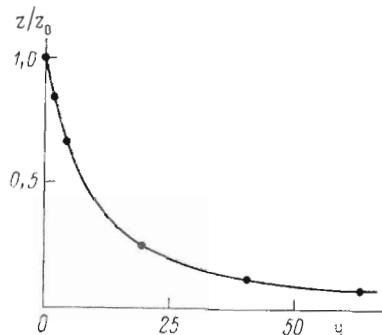


Рис. 4

Рис. 3. Взаимозависимость скоростей сольволиза N,N-диметил-2-фенилазиридиния и его реакции с ацетилхолинэстеразой при 8 и 45° С. Обозначения точек см. в подписи к рис. 2

Рис. 4. Высвобождение радиоактивной метки от модифицированной азиридиниевым ионом ацетилхолинэстеразы, z — радиоактивность белка

константа. Из рис. 2 видно, что экспериментальные данные для реакции азиридиниевого иона в активном центре фермента и сольволиза этого реагента в нейтральной среде хорошо описываются единой линейной зависимостью, которая характеризуется следующими параметрами: $\beta = (381 \pm 35)^\circ$, $A_1 = 98,8 \pm 2,3$, $R = 0,973$, $s_0 = 5,8$ (R — коэффициент корреляции, s_0 — стандартное отклонение). Следовательно, для большинства исследованных реакций соблюдается единая изокинетическая зависимость. Исключением является только щелочной гидролиз азиридиниевого иона (рис. 2, 8), что связано с изменением механизма реакции сольволиза при переходе из нейтральной среды в щелочную [6].

2. По зависимости между $\lg k(T_1)$ и $\lg k(T_2)$ (рис. 3), описываемой уравнением [10]:

$$\lg k(T_2) = A_2 + \kappa \lg k(T_1), \quad (4)$$

где

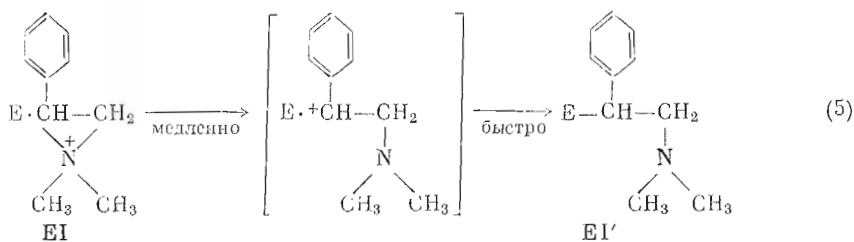
$$\kappa = \frac{(T_2 - \beta) T_1}{(T_1 - \beta) T_2}, \quad A_2 — \text{константа.}$$

Обработка кинетических данных ингибирования фермента и сольволиза азиридиниевого иона при 8 и 45° С дает значения $\kappa = 0,68 \pm 0,06$, $A_2 = -0,29 \pm 0,27$, $R = 0,973$, $s_0 = 0,109$. При этом, как и в случае уравнения (3), данные для реакции с ферментом и сольволиза азиридиниевого соединения в нейтральной среде достоверно описываются единой зависимостью. В то же время точка для щелочного гидролиза значительно отклоняется от этой прямой.

Исследование зависимости (4) имеет преимущество перед применением уравнения (3), так как в первом случае в анализе используются независимые экспериментальные величины, обладающие большей точностью по сравнению с активационными параметрами [10].

Таким образом, из приведенных выше данных можно заключить, что превращение N,N-диметил-2-фенилазиридиния в активном центре ацетилхолинэстеразы и сольволиз этого реагента в разных нейтральных средах составляют единую изокинетическую зависимость. В то же время данные по щелочному гидролизу отклоняются от этой зависимости в силу иного механизма реакции. На основании этих фактов и установленного ранее S_N1 -механизма сольволиза азиридиниевого соединения в нейтральной среде [6] можно заключить, что модификация ацетилхолинэстеразы N,N-диметил-2-фенилазиридинием протекает также по S_N1 -механизму

через образование карбониевого иона на скоростьопределяющей стадии:



Несмотря на одинаковый механизм реакций превращений азиридилиевого иона, протекающих в активном центре ацетилхолинэстеразы и в разных водно-органических растворителях, образование карбониевого иона в активном центре фермента сопровождается более положительным значением ΔS^\ddagger по сравнению с реакциями сольволиза (рис. 2). В рамках S_N1 -механизма это можно объяснить прежде всего различной степенью преобразования сольватного окружения азиридилиевого иона в процессе образования карбониевого иона в растворе и при взаимодействии с белком. Вероятно, жесткая структура белка, а также предварительная фиксация азиридилиевого иона в активном центре фермента на стадии нековалентного связывания значительно уменьшают возможности структурных перестроек окружения реагента на ковалентной стадии реакции с ацетилхолинэстеразой.

На основании полученных результатов естественно предположить, что скорость реакции превращения азиридилиевого иона в активном центре ацетилхолинэстеразы и скорость его сольволиза определяются одними и теми же факторами, а именно основной сольватацией реагента [6]. При этом неизменным условием действия общих закономерностей для данной реакционной серии является соблюдение единой изокINETической зависимости [10]. В связи с этим открывается возможность использования азиридилиевого иона в качестве «химического зонда» для исследования сольватационных свойств в центре связывания фермента. Исходя из линейной зависимости между логарифмом константы скорости процесса и параметром общей основности среды B [10], которая для реакций азиридилиевого иона имеет вид

$$\lg k = -5,8 + 0,011 B, \quad (6)$$

можно дать количественную оценку общей основности центра связывания. Поскольку B -шкала характеризует структуру сольватирующих групп, полученные с помощью химического зондирования результаты могут дать информацию о химической природе тех аминокислотных остатков, которые взаимодействуют с «зондом» (см. [11]). Для места связывания азиридилиевого иона в активном центре ацетилхолинэстеразы получим по уравнению (6) $B=164$. Этой величине близки B -константы ряда растворителей с функциональными группами слабой основности — например, карбоксил- и гидроксилсодержащих растворителей, а также простых и сложных эфиров [10]. Следовательно, в центре связывания азиридилиевого иона можно предположить наличие соответствующих функциональных групп, прежде всего гидроксильных или карбоксильных, остатков аминокислот.

В настоящей работе сделана попытка охарактеризовать нуклеофильный компонент реакции алкилирования ацетилхолинэстеразы. Для этой цели изучалась кинетика спонтанного разрушения связи меченного триптем модификатора с белком. Реакцию наблюдали по высвобождению низкомолекулярного радиоактивного продукта с использованием гелехроматографии. Из рис. 4 видно, что инкубация модифицированного фермента при pH 7,5 приводит к полному разделению радиоактивного лиганда и белка. Время полупревращения этого процесса, описываемого кинетикой первого порядка, составляет при 25° С 9,5 ч. Отсюда следует, что в рассматриваемой реакции взаимодействия ацетилхолинэстеразы с азиридилиевым ионом модифицируется, по всей вероятности, только один ами-

нокислотный остаток фермента. В результате этой реакции образуется относительно легко гидролизуемая сложноэфирная или амидная связь.

Можно предположить, что в структуре фермента этерифицируется некая карбоксильная группа, расположенная в районе так называемого анионного центра связывания катионных лигандов. В пользу такого предположения свидетельствует относительно высокая скорость спонтанного расщепления образующейся в реакции модификации белка связи, что трудно объяснить с точки зрения образования N-алкиламидной группы. Однако для более подробной характеристики химической природы алкилируемого азиридинового иона аминокислотного остатка активного центра фермента необходимо провести исследование в кислотной и щелочной средах, так как в этих условиях обнаруживаются принципиальные различия в реакционной способности сложных эфиров и амидов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез N,N-диметил-2-фенилазиридиния и исходных веществ описан в работе [3]. Меченый тритием до удельной радиоактивности 29 Ки/ммоль азиридиновый ингибитор получен как описано в работе [8]. Гомогенный препарат ацетилхолинэстеразы яда кобры получен методом аффинной хроматографии [12] в Институте химической и биологической физики АН ЭССР. Активность ацетилхолинэстеразы определяли спектрофотометрическим методом по начальной скорости гидролиза ацетилтиохоллина [13]. Кинетику ингибирования фермента азиридиновым ионом измеряли как описано в работе [8]. Опыты проводили в интервале температур от 8 до 45°С в 0,15 М фосфатном буфере, pH 7,5. В отдельных экспериментах было показано, что термоинактивацией фермента в условиях проведения опытов можно пренебрегать. Обработку результатов кинетических измерений проводили методом нелинейных наименьших квадратов на ЭВМ Commodore 4-Plus.

Для селективной модификации радиоактивным ингибитором только второго центра, связывающего ион азиридиния, мечение фермента осуществляли в два этапа. Вначале к раствору фермента добавляли раствор нерадиоактивного азиридинового ингибитора ($1 \cdot 10^{-3}$ М). При этом в течение 30 мин достигается практически полное модифицирование первого связывающего центра [7]. В этих условиях опыта степень модифицирования второго, исследуемого в настоящей работе, центра не превышает 10%. Затем в реакционную смесь добавляли радиоактивный лиганд в таком количестве, чтобы удельная радиоактивность азиридинового ингибитора в растворе составляла 1,5 Ки/ммоль. Реакционную смесь выдерживали 15 ч при 25°С, после чего белковую фракцию отделяли от низкомолекулярных радиоактивных веществ на колонке с сефадексом G-50 (средний, Pharmacia, Швеция). Содержащий радиоактивную метку блок инкубировали при 25°С в 0,15 М фосфатном буфере, pH 7,5. Концентрация ацетилхолинэстеразы составляла $2 \cdot 10^{-8}$ М. Из этого раствора отбирали в определенные моменты времени пробы, в которых методом гель-хроматографии на колонках с сефадексом G-50 отделяли радиоактивную фракцию, содержащую белок, от низкомолекулярных радиоактивных веществ, как описано в работе [8], и рассчитывали константу скорости гидролиза связи модификатора с белком.

ЛИТЕРАТУРА

1. Belleau B., Tani H. *Mol. Pharmacol.*, 1966, v. 2, № 5, p. 411–422.
2. Purdie J. E. *Biochim. et biophys. acta*, 1969, v. 185, № 1, p. 122–133.
3. Palumaa P., Mähar A., Järv J. *J. Bioorgan. Chem.*, 1982, v. 11, № 3, p. 394–403.
4. Belleau B., Di Tullio V. *Can. J. Biochem.*, 1971, v. 49, № 10, p. 1131–1133.
5. Charman N. B., Triggle D. J. *J. Chem. Soc.*, 1963, v. 256, p. 1385–1400.
6. Палумма П. Я., Соометс У. В., Ярв Я. Л. *Реакц. способность орган. соедин.*, 1985, т. 22, № 2, с. 238–257.
7. Палумма П. Я., Райдару Г. И., Ярв Я. Л., Шевченко В. П., Мясоедов Н. Ф. *Биоорган. химия*, 1985, т. 11, № 10, с. 1348–1352.
8. Палумма П. Я., Кязмбре Т. Х., Ярв Я. Л. *Биоорган. химия*, 1983, т. 9, № 10, с. 1348–1356.
9. Гаммет Л. *Основы физической органической химии*. М.: Мир, 1972, с. 504–525.
10. Пальм В. А. *Основы количественной теории органических реакций*. Л.: Химия, 1967, с. 243–266.
11. Palumaa P., Järv J. *Biochim. et biophys. acta*, 1984, v. 784, № 1, p. 35–39.
12. Raba R., Aviksaar A., Raba M., Siigur J. *Eur. J. Biochem.*, 1979, v. 96, № 1, p. 151–158.
13. Ellmann G. L., Courtney K. D., Andres V., Jr., Featherstone R. M. *Biochem. and Pharmacol.*, 1961, v. 7, № 1, p. 88–95.

Поступила в редакцию
6.III.1986
После доработки
21.V.1986

MECHANISM OF REACTION OF N,N-DIMETHYL-2-PHENYL-
AZIRIDIUM ION IN ACETYLCHOLINESTERASE ACTIVE CENTRE

SOOMETS U. V., PALUMAA P. J., YÄRV J. L.

Tartu State University, Tartu

Effect of temperature on the rate of the bond-breaking step of acetylcholinesterase modification with N,N-dimethylaziridinium ion was studied within 8 to 45° C temperature interval. For this reaction measured by irreversible inhibition of the acetylcholinesterase-catalyzed hydrolysis of acetylthiocholine the activation parameters $\Delta H^\ddagger=94$ kJ/mole and $\Delta S^\ddagger(25^\circ\text{C})=-9,4$ J/mol-deg were obtained. Processing of these data together with our earlier results on spontaneous solvolysis of the aziridinium ion in various water-solvent mixtures showed that all these reactions form a common isokinetic series. That gave evidence of the S_N1 mechanism of the alkylation reaction occurring at the acetylcholinesterase active centre. Kinetics of spontaneous decomposition of the covalent bond between the aziridinium reagent and protein molecule was studied. This reaction followed the first-order kinetics and lead to complete liberation of the label from the enzyme, thus suggesting that a single carboxylic or amide group in the active centre was modified by the aziridinium ion.