



УДК 577.153.4 : 577.15.17

АЛКИЛИРОВАНИЕ ХОЛИНЭСТЕРАЗ
N,N-ДИМЕТИЛ-2-ФЕНИЛАЗИРИДИНИЕМ
И N,N-ДИМЕТИЛ-2-*n*-НИТРОФЕНИЛАЗИРИДИНИЕМ

Волкова Р. И., Кочетова Л. М.

*Институт эволюционной физиологии и биохимии им. Н. М. Сеченова
Академии наук СССР, Ленинград*

Кинетика реакции ацетилхолинэстеразы (КФ 3.1.1.7), бутирилхолинэстеразы (КФ 3.1.1.8) и пропионилхолинэстеразы (КФ 3.1.1.8) с N,N-диметил-2-фенилазиридином и N,N-диметил-2-*n*-нитрофенилазиридином согласуется с наличием обратной ассоциативной стадии. Бимолекулярные константы скорости (k_{II}) реакции ацетил- и бутирилхолинэстераз с ДФА ($4,6 \cdot 10^2$ и $93 \text{ M}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$) значительно выше, чем с ДНФА ($10,5$ и $5,3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$), и, наоборот, k_{II} реакции пропионилхолинэстеразы с ДНФА ($40 \text{ M}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$) в 2 раза выше, чем с ДФА. В случае ацетил- и бутирилхолинэстераз величины k_{II} коррелируют с K_{II} и K_I — константами, характеризующими обратимую сорбцию ионов азиридиния, а qk_2 , характеризующие стадию алкилирования, практически не изменяются, оставаясь порядка 10^{-2} мин^{-1} для всех холинэстераз. Из трех типов холинэстераз только ацетилхолинэстераза, алкилированная ДФА, при полной утрате способности гидролизовать ацетилхолин (АХ) обладает модифицированными каталитическими свойствами — способностью с более высокой скоростью, чем нативный фермент, гидролизовать незаряженный субстрат индофенилацетат. Выявлено защитное действие ионов тетраэтиламмония в реакции ДНФА с ацетил- и бутирилхолинэстеразами и активирующее — в реакции с пропионилхолинэстеразой. На основании значительной неконкурентной части в обратимом торможении ионами ДФА и ДНФА гидролиза АХ под действием ацетил- и бутирилхолинэстераз высказано предположение, что ионы азиридиния могут обратимо связывать и алкилировать как анноновый участок в активном центре, так и периферические анионные участки аллостерического регуляторного центра холинэстераз.

Необратимые фосфорорганические ингибиторы холинэстераз, фосфорилирующие в активном центре гидроксил серина — основную функциональную группу, при непосредственном участии которой осуществляется холинэстеразный катализ, исследованы наиболее полно. Значительно меньше изучены необратимые ингибиторы холинэстераз, ковалентно связывающие функциональные группы фермента, играющие вспомогательную роль в катализе (например, анионную группировку активного центра, ответственную за специфическую ионную сорбцию субстратов). Такими необратимыми ингибиторами являются 2-галоидоалкиламины, способные в форме циклических иммониевых ионов алкилировать преимущественно карбоксилатные и фосфатные анионы, а также гидроксильные, сульфгидрильные и аминокгруппы белка [1, 2].

Скращения: ДФА — N,N-диметил-2-фенилазиридиний; ДНФА — N,N-диметил-2-*n*-нитрофенилазиридиний; АХ — ацетилхолин; ИФА — индофенилацетат; ФОИ — фосфорорганические ингибиторы; ТЭА — тетраэтиламмоний.

Таблица 1

**Кинетические параметры ферментативного гидролиза АХ и ИФА
под действием холинэстераз**

Ферменты	АХ (0,1 М КСl; 0,0067 М фосфатный бу- фер, рН 7,5; 25°)				ИФА (0,08 М КСl; 0,027 М фосфатный буфер, рН 8; 22—23°)			
	$K_m,$ М	$V,$ М·мг ⁻¹ · мин ⁻¹	$V/K_m,$ мг ⁻¹ ·мин ⁻¹	$a_c,$ мин ⁻¹	$K_m,$ М	$V,$ М·мг ⁻¹ · мин ⁻¹	$V/K_m,$ мг ⁻¹ ·мин ⁻¹	$a_c,$ мин ⁻¹
Ацетил- холин- эстераза	$0,9 \cdot 10^{-4}$	$1,3 \cdot 10^{-6}$	$1,44 \cdot 10^{-2}$	$3 \cdot 10^5$	$8,7 \cdot 10^{-4}$	$1,5 \cdot 10^{-8}$	$0,17 \cdot 10^{-4}$	$3,5 \cdot 10^3$
Бутирил- холин- эстераза	$6,7 \cdot 10^{-4}$	$2,5 \cdot 10^{-6}$	$0,37 \cdot 10^{-2}$	$6 \cdot 10^4$	$2,8 \cdot 10^{-4}$	$4,4 \cdot 10^{-8}$	$1,57 \cdot 10^{-4}$	$1,1 \cdot 10^3$
Пропионил- холин- эстераза	$4,5 \cdot 10^{-5}$	$5,8 \cdot 10^{-5}$	1,29	$1 \cdot 10^5$	$1,1 \cdot 10^{-3}$	$5,0 \cdot 10^{-6}$	$4,55 \cdot 10^{-3}$	$9,0 \cdot 10^3$

В 1966 г. Беллау и Тани [3] показали, что ионы N,N-диметил-2-фенилазиридиния специфически и необратимо ингибируют гидролиз ацетилхолина под действием ацетилхолинэстеразы из эритроцитов быка. Установлено, что ацетилхолинэстераза, ингибированная ДФА, обладает модифицированными эстеразными свойствами — способностью с более высокой скоростью, чем нативный фермент, гидролизовать незаряженный хромогенный субстрат индофенилацетат [4, 5]. Такая же модификация эстеразных свойств после обработки ионами ДФА выявлена и у ацетилхолинэстеразы из электрического органа угря [6]. Позже было исследовано ингибирующее действие на холинэстеразы других галоидоалкиламинов, содержащих этиленимониевую группу: дибенамина, дибензилина [7] и некоторых производных азиридиния [8]. Поскольку предполагается, что действие ионов азиридиния связано с алкилированием анионной группировки в активном центре [3], представляет интерес сравнительное исследование кинетики ингибирования производными азиридиния холинэстераз (из разных источников), проявляющих различие в свойствах анионного центра и его гидрофобного окружения [9, 10]. В настоящей работе исследована кинетика ингибирования ацетилхолинэстеразы (КФ 3.1.1.7) из эритроцитов человека и двух типов холинэстераз (КФ 3.1.1.8): бутирилхолинэстеразы из сыворотки крови лошади и пропионилхолинэстеразы из мозговой ткани ионами ДФА и его нитрозамещенного производного — N,N-диметил-2-нитрофенилазиридиния.

Поскольку изменение в каталитических свойствах холинэстераз при взаимодействии с производными азиридиния оценивали по их способности гидролизовать два различных субстрата АХ и ИФА, первоначально исследовали скорости ферментативного гидролиза этих субстратов под действием холинэстераз (табл. 1). Для расчета активности каталитического центра (a_c) по отношению к АХ использовали величины концентрации активных центров (c_a) холинэстераз, определенные путем титрования специфически-ми катионными ФОИ: $\text{CH}_3(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})\text{P}(\text{O})\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{S}^+(\text{CH}_3)\text{R}$ [10]. Те же самые величины c_a использовали и для расчета a_c ИФА, предполагая, что гидролиз ИФА осуществляется теми же активными центрами, что и гидролиз АХ. Это подтверждается практическим совпадением k_{II} ингибирования всех видов холинэстераз различными ФОИ при определении v_0 и v_t в опытах как с АХ, так и с ИФА.

В отличие от ранее опубликованных данных [11] результаты, приведенные в табл. 1, показывают, что ИФА, как субстрат холинэстераз, значительно хуже, чем АХ. Константы V и a_c , характеризующие скорость ферментативного гидролиза ИФА, составляют для ацетил-, бутирил- и

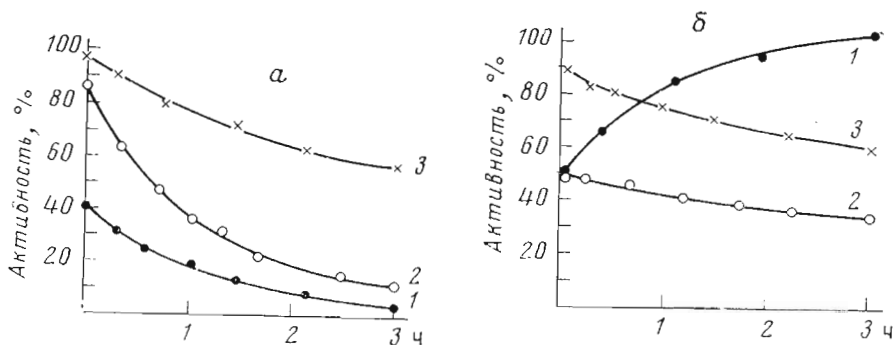
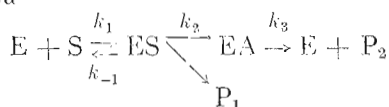


Рис. 1. Влияние ДФА ($5 \cdot 10^{-4}$ М) на скорость гидролиза ацетилхолина (а) и индофенилацетата (б) под действием различных холинэстераз: 1 — ацетилхолинэстераза, 2 — бутирилхолинэстераза, 3 — пропионилхолинэстераза

пропионилхолинэстераз соответственно 1,2; 1,7; 8,6% от скорости гидролиза АХ. Пропионилхолинэстераза гидролизует ИФА с наибольшей скоростью, далее идут бутирил- и ацетилхолинэстераза. По скорости гидролиза АХ исследованные ферменты располагаются иначе: ацетилхолинэстераза > пропионилхолинэстераза > бутирилхолинэстераза. K_m ИФА ниже, чем K_m АХ для бутирилхолинэстеразы, для ацетилхолинэстеразы K_m ИФА и АХ близки, а для пропионилхолинэстеразы K_m ИФА значительно выше, чем АХ. Отношение V/K_m для трехстадийной схемы холинэстеразного гидролиза



по существу представляет собой бимолекулярную константу скорости образования фермент-ингибиторного комплекса

$$\left(V/K_m = \frac{k_1 k_2}{k_{-1} + k_2} [E]_0 \right).$$

Величины V/K_m для всех холинэстераз значительно выше при гидролизе АХ, чем при гидролизе ИФА.

Влияние ДФА на каталитическую активность ацетилхолинэстеразы, оцениваемую по гидролизу АХ и ИФА, различно (рис. 1). При ферментативном гидролизе АХ вслед за быстро устанавливающимся на определенном уровне обратимым ингибированием наблюдается медленно развивающееся во времени необратимое ингибирование, которое через 3 ч после инкубации с ДФА ($5 \cdot 10^{-4}$ М) приводит к практически полной утрате способности гидролизовать АХ. При ферментативном гидролизе ИФА вслед за первоначальным обратимым ингибированием наблюдается развивающееся во времени повышение скорости гидролиза ИФА до 120—160% от исходной величины. Таким образом, обработанная ионами ДФА, ацетилхолинэстераза практически не гидролизует АХ и обладает модифицированными каталитическими свойствами — способностью с более высокой скоростью, чем нативный фермент, гидролизовать неспецифический субстрат ИФА. Такая модификация каталитических свойств под действием ДФА наблюдается только для ацетилхолинэстеразы. В опытах с бутирил- и пропионилхолинэстеразами кинетика ингибирующего действия ДФА на скорости гидролиза АХ и ИФА идентична и представляет собой параллельное нарастание во времени необратимого ингибирования. Однако бутирилхолинэстераза, обработанная ДФА, при полной потере каталитической активности по отношению к АХ сохраняет некоторую способность гидролизовать ИФА, не превышающую 20% от начальной скорости гид-

Таблица 2

Влияние ДФА на скорости ферментативного гидролиза АХ и ИФА под действием бутирилхолинэстеразы (ДФА $5 \cdot 10^{-3}$ М)

Время инкубации с ДФА, мин	Остаточная скорость гидролиза после гель-фильтрации, %	
	АХ ($1 \cdot 10^{-3}$ М)	ИФА ($3 \cdot 10^{-4}$ М)
30	34,0	55,0
180	1,9	21,7

ролиза (табл. 2). Развивающееся во времени действие ДФА на холинэстеразы не изменяется после диализа или гель-фильтрации через колонки с сефадексом G-25.

ДНФА не обладает способностью модифицировать каталитические свойства ни одного из исследованных ферментов. Для всех трех типов холинэстераз наблюдается нарастающее во времени ингибирование гидролиза как АХ, так и ИФА.

Ингибирующее действие попов азиридиция на холинэстеразы имеет сложный характер: четко выявляется обратимое торможение, устанавливающееся сразу же на определенном уровне и зависящее от [I], и необратимое, прогрессивно нарастающее во времени и не снижающееся после диализа или гель-фильтрации.

Исследование обратимого ингибирования ферментативного гидролиза АХ методом Лайнуивера и Берка показало, что ионы ДФА и ДНФА, содержащие четвертичный азот в трехчленном кольце, являются ингибиторами смешанного конкурентно-неконкурентного типа. Неконкурентная

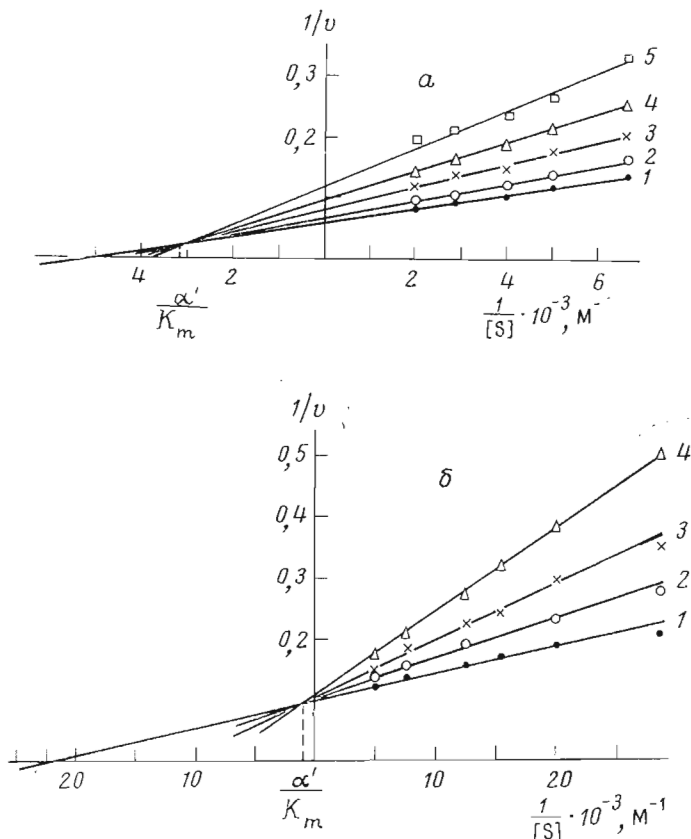


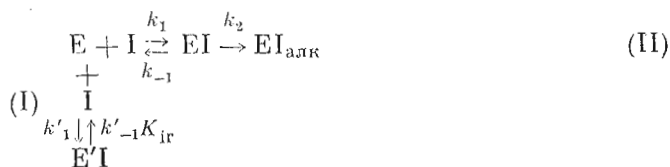
Рис. 2. Зависимости Лайнуивера и Берка при ингибировании холинэстераз ДНФА: а — ацетилхолинэстераза ($[I] \cdot 10^{-4}$ М: 1 — 0; 2 — 1; 3 — 2; 4 — 4; 5 — 6; $K_i = 3,9 \cdot 10^{-4}$ М; $\alpha' = 0,62$); пропониолилхолинэстераза ($[I] \cdot 10^{-4}$ М: 1 — 0; 2 — 3; 3 — 6; 4 — 9; $K_i = 6 \cdot 10^{-4}$ М; $\alpha' = 0,03$)

доля торможения, оцениваемая величиной α' [12], особенно велика для обратимого ингибирования ацетилхолинэстеразы: α составляет 0,76 для ДФА и 0,63 для ДНФА (рис. 2), т. е. торможение практически полностью неконкурентно. При ингибировании бутирилхолинэстеразы величины α' несколько ниже: 0,32 для ДФА и 0,27 для ДНФА. В случае пропионилхолинэстеразы неконкурентная часть в торможении еще меньше: α' составляет 0,19 для ДФА, а ингибирование фермента ДНФА практически конкурентно, $\alpha' \rightarrow 0$ (рис. 2).

Кинетические константы обратимого ингибирования ферментативного гидролиза АХ K_i и α' для различных холинэстераз, определенные методом Лайнуивера и Берка, и константы обратимого ингибирования ферментативного гидролиза ИФА — K_{is} , рассчитанные по величине отрезка, отсекаемого на оси ординат экспериментальной прямой в координатах $\lg(v_0/v_t)$ от t , приведены в табл. 3.

Ионы ДФА и ДНФА обладают наиболее высоким сродством по отношению к ацетилхолинэстеразе: K_i самые низкие. Для бутирил- и пропионилхолинэстераз K_i значительно выше, особенно в случае ДФА. Введение нитрогруппы в фенильное кольцо приводит к снижению ингибирующего действия и одновременно к уменьшению неконкурентной части в торможении: K_i для ДНФА выше, а α' ниже, чем для ДФА, по отношению ко всем трем типам холинэстераз. Более всего при введении нитрозаместителя снижается обратимое ингибирование ацетилхолинэстеразы: K_i возрастают примерно в 15 раз, для бутирилхолинэстеразы — в 4,6 раза, а в случае пропионилхолинэстеразы — только в 2,5 раза. Константы обратимого ингибирования в системе, содержащей ИФА, для бутирил- и пропионилхолинэстераз близки к K_i , определенным в присутствии АХ. В случае ацетилхолинэстеразы K_{is} обратимого ингибирования гидролиза ИФА заметно выше K_i ферментативного гидролиза АХ.

Константы скорости необратимого ингибирования ($k_{II,э}$) зависят от [I]: при увеличении [I] наблюдается заметное закономерное снижение $k_{II,э}$. Зависимость $k_{II,э}$ от [I] может быть связана как с тем, что обратимая сорбция азиридиниевых ионов и их необратимое алкилирующее действие осуществляется по разным участкам активной поверхности с образованием различных обратимых комплексов EI и E'I, так и с наличием обратной стадии в необратимом алкилирующем действии ДФА и ДНФА [13, 14]:



При образовании отдельного обратимого комплекса E'I (I)

$$k_{II,э} = \frac{k_{II,0}}{1 + [I]/K_{ir}} \quad (1)$$

и, следовательно,

$$1/k_{II,э} = \frac{[I]}{k_{II,0} K_{ir}} + \frac{1}{k_{II,0}} \quad (2)$$

Наличие обратной стадии EI, предшествующей алкилированию, приводит к аналогичному уравнению при условии $k_{-1} \gg k_2$ [15]. В данном случае

$$k_{II,0} \simeq \frac{k_1 q k_2}{k_{-1}}$$

и поэтому

$$1/k_{II,э} = \frac{[I]}{q k_2} + \frac{k_{-1}}{k_1 q k_2} \cdot$$

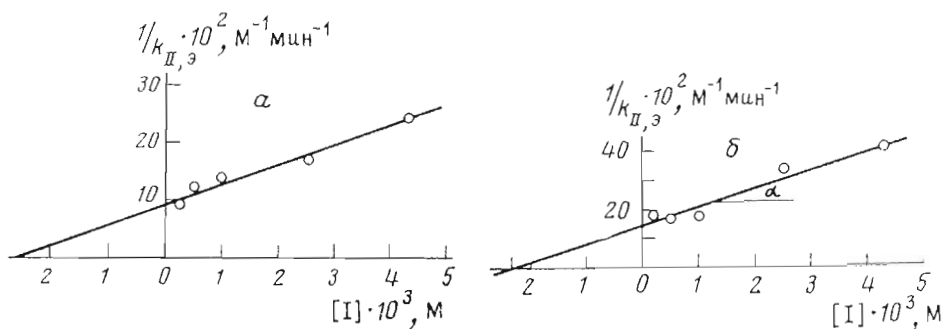


Рис. 3. Зависимость $1/k_{II}$ от $[I]$ при ингибировании ацетилхолинэстеразы *n*-нитро-фенилазиридином. Субстраты: а — ацетилхолин ($K_{ir} = 2,6 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $k_{II,0} = 10,5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$, $qk_2 = 2,7 \cdot 10^{-2} \text{ мин}^{-1}$); б — индофенилацетат ($K_{ir} = 2,3 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $k_{II,0} = 7,0 \text{ M}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$, $qk_2 = 1,7 \text{ мин}^{-1}$)

В связи с этим кинетические параметры, найденные из зависимости $1/k_{II,3}$ от $[I]$, могут быть отнесены к обоим предполагаемым механизмам. Кинетически идентифицировать их преимущественную принадлежность к одному из этих механизмов невозможно. $k_{II,0}$, K_{ir} и qk_2 , найденные из зависимости $1/k_{II,3}$ от $[I]$ (рис. 3) согласно уравнениям 1 и 2, приведены в табл. 3.

Константы скорости реакции ионов ДФА с ацетилхолинэстеразой, определенные из кинетики необратимого ингибирования ферментативного гидролиза АХ и из кинетики активации ферментативного гидролиза ИФА (рис. 4), достаточно близки: $k_{II,0}$ различаются только в 1,6 раза, а величины мономолекулярных констант, характеризующих алкилирование (qk_2), практически одинаковы. По-видимому, ингибирование ферментативного гидролиза АХ и активация ферментативного гидролиза ИФА обусловлены одной и той же химической реакцией ДФА с функциональными группами ацетилхолинэстеразы, расположенными вне эстеразного центра. Наиболее высокие $k_{II,0}$ получены для реакции ДФА с ацетилхолинэстеразой — $4,6-2,5 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$. $k_{II,0}$ реакции ДФА с бутирилхолинэстеразой и особенно с пропионилхолинэстеразой значительно ниже. Константы qk_2 , характеризующие алкилирование исследованных типов холинэстераз ионами ДФА, различаются в значительно меньшей степени, чем $k_{II,0}$. По необратимому действию на ацетил- и бутирилхолинэстеразы ДФА значительно превосходит нитрозамещенное производное: $k_{II,0}$ реакции ДФА с ацетилхолинэстеразой в 50 раз и с бутирилхолинэстеразой ~ в 20—30 раз выше, чем $k_{II,0}$ взаимодействия этих ферментов с ДНФА. В случае пропионилхолинэстеразы, наоборот, $k_{II,0}$ ДНФА более чем в 2 раза выше $k_{II,0}$ ДФА. Для ДНФА так же, как и для ДФА, величины qk_2 для всех исследованных ферментов различаются в меньшей степени, чем $k_{II,0}$. Для всех типов холинэстераз и обоих производных азиридиния qk_2 достаточно низки и выражаются величинами одного порядка: $\sim 10^{-2} \text{ мин}^{-1}$. Экспериментальные данные демонстрируют корреляцию $k_{II,0}$ с величинами K_{ir} , характеризующими наличие обратимой компоненты в необратимом связывании ионов азиридиния. Чем ниже K_{ir} , тем выше величины $k_{II,0}$. Наличие такой корреляции свидетельствует о том, что обратимое ингибирование, выявляемое в процессе необратимого действия ионов азиридиния из зависимости $1/k_{II,3}$ от $[I]$, скорее связано с наличием обратимой стадии в двухстадийном процессе алкилирования холинэстераз (механизм II), чем с образованием тупикового обратимого комплекса E'I, не подвергающегося дальнейшему алкилированию.

Для ДФА параметры K_i и K_{is} , определенные в системе, содержащей соответственно АХ и ИФА, достаточно близки к величинам K_{ir} , характеризующим обратимую сорбцию алкилирующего агента на активной поверхности фермента в процессе его необратимого связывания. Близость

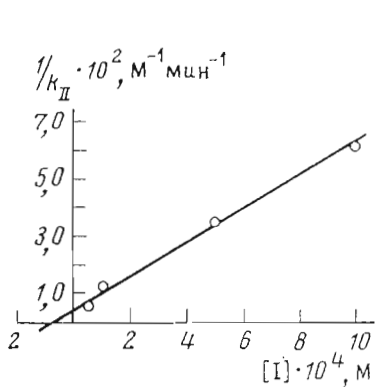


Рис. 4

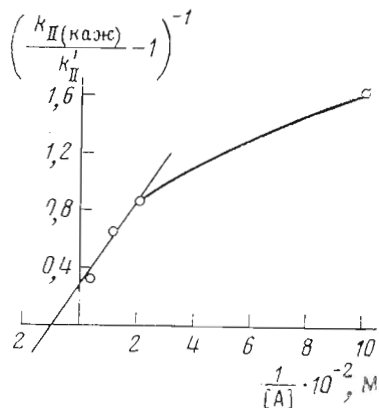


Рис. 5

Рис. 4. Зависимость $1/k_{II}$ от $[DFA]$ при активации ферментативного гидролиза индофенилацетата под действием ацетилхолинэстеразы ($K_{ir} = 0,7 \cdot 10^{-4}$ М, $k_{II,0} = 2,5 \cdot 10^2$ М $^{-1} \cdot$ мин $^{-1}$, $qk_2 = 1,7 \cdot 10^{-2}$ мин $^{-1}$)

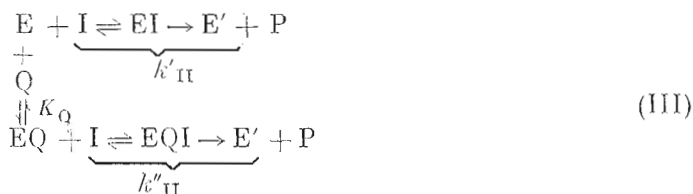
Рис. 5. Определение кинетических параметров (K_Q и β) влияния ТЭА на реакцию алкилирования пропионилхолинэстеразы *n*-нитрофенилазиридином ($K_Q = 3 \cdot 10^{-3}$ М, $\beta = 4,2$)

этих параметров наблюдается для всех трех холинэстераз. Для нитрозамещенного азиридиния в случае всех трех типов холинэстераз K_{ir} несколько выше K_i и K_{is} .

Для идентификации участков связывания производных азиридиния на активной поверхности холинэстераз существенное значение имеет исследование влияния на их реакцию с ферментом катионных соединений, специфически и обратимо блокирующих анионный участок активного центра.

Установлено, что катионные субстраты и ингибиторы (АХ, ионы тетраалкиламмония) проявляют защитное действие в реакции незамещенного ДФА с ацетилхолинэстеразой [5, 16]. Наряду с рН-зависимостью алкилирующего действия [7] этот факт явился важным аргументом в пользу представления о том, что ионы азиридиния связываются ацетилхолинэстеразой и алкилируют фермент по анионному центру, который, по-видимому, образован карбоксилат-анионом. В наших экспериментах катионный ингибитор холинэстераз — тетраэтиламмоний в концентрациях, значительно больших K_i , оказывал выраженное защитное действие в реакции ДНФА с ацетил- и бутирилхолинэстеразами: $k_{II,0}$ ингибирования этих ферментов в присутствии ТЭА снижались в 2,5—2,7 раза (табл. 4). В опытах с пропионилхолинэстеразой наблюдалось не защитное, а активирующее действие ионов ТЭА в реакции фермента с ДНФА: $k_{II,0}$ увеличивались в 3—3,5 раза. В реакции с незамещенным азиридином ионы ТЭА проявляли обычное защитное действие, однако защитный эффект был невелик: k_{II} снижались только в 1,7 раза.

Взаимодействие ионов азиридиния (I) с холинэстеразами (E) в присутствии ТЭА (Q) можно выразить следующей схемой:



Кинетические константы обратимого и необратимого ингибирования холинэстераз ДФА и ДНФА

Фермент	Формы ингибитора	Субстрат АХ					Субстрат ПФА				
		K_i, M	α'	K_{ir}, M	$K_{ii}, M^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$	$q/k_2, \text{мин}^{-1}$	K_{is}, M	K_{ir}, M	$k_{ii}, M^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$	$q/k_2, \text{мин}^{-1}$	
Ацetylхолинэстераза	ДФА	$2,5 \cdot 10^{-5}$	0,76	$2,5 \cdot 10^{-5}$	$4,6 \cdot 10^{+2}$	$1,2 \cdot 10^{-2}$	$1,1 \cdot 10^{-4}$	$7 \cdot 10^{-5}$ *	$2,5 \cdot 10^2$ *	$1,7 \cdot 10^{-2}$ *	
	ДНФА	$3,7 \cdot 10^{-4}$	0,63	$2,6 \cdot 10^{-3}$	10,5	$2,7 \cdot 10^{-2}$	$1,5 \cdot 10^{-3}$	$3 \cdot 10^{-3}$	6,0	$1,8 \cdot 10^{-2}$	
Бутирилхолинэстераза	ДФА	$1,8 \cdot 10^{-4}$	0,32	$1,7 \cdot 10^{-4}$	93,0	$1,5 \cdot 10^{-2}$	$1,2 \cdot 10^{-3}$	$9 \cdot 10^{-5}$	72,0	$0,7 \cdot 10^{-2}$	
	ДНФА	$8,3 \cdot 10^{-4}$	0,27	$1,2 \cdot 10^{-3}$	5,3	$0,8 \cdot 10^{-2}$	$0,9 \cdot 10^{-3}$	$2,4 \cdot 10^{-3}$	2,2	$0,5 \cdot 10^{-2}$	
Пропионилхолинэстераза	ДФА	$2,5 \cdot 10^{-4}$	0,21	$3,0 \cdot 10^{-4}$	20,0	$0,6 \cdot 10^{-2}$	$4,1 \cdot 10^{-4}$	$2 \cdot 10^{-4}$	20,0	$0,4 \cdot 10^{-2}$	
	ДНФА	$6,3 \cdot 10^{-4}$	0,02	$1,0 \cdot 10^{-3}$	49,0	$4,0 \cdot 10^{-2}$	$1,0 \cdot 10^{-3}$	—	44,6	—	

* Константы, полученные из кинетики активации гидролиза ИФА.

Влияние ионов ТЭА на необратимое связывание холинэстераз с ДФА и ДНФА

Фермент	Ингибитор		ТЭА			КП, $M^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$		β	$\frac{1}{1+Q/KQ}$	$\frac{k_{II}(\text{важ})}{k_{II}}$
	[I], M	K_{ir}, M	[Q], M	K_Q, M	α'	без ТЭА k_{II}	в присутствии ТЭА $k_{II}(\text{важ})$			
Ацetylхолинэстераза	$1 \cdot 10^{-2}$	ДНФА $2,6 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-2}$	$6,0 \cdot 10^{-4}$	0,05	7,6	3,4	0,372	0,057	0,44
	$1 \cdot 10^{-2}$		$1 \cdot 10^{-1}$	$1,0 \cdot 10^{-3}$	0,12	0,7	0,26	0,375	0,01	0,372
	$1 \cdot 10^{-4}$		$1 \cdot 10^{-2}$	$8,7 \cdot 10^{-4}$	0,21	32,2	109,0	3,72	—	—
Бутирилхолинэстераза	$2 \cdot 10^{-3}$	ДФА $3,0 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-2}$	$8,7 \cdot 10^{-4}$	0,21	3,8	2,24	0,56	0,08	0,59
	$2 \cdot 10^{-3}$		$1 \cdot 10^{-2}$	$1 \cdot 10^{-2}$	—	—	—	—	—	—

где EI, EQ и EQI — соответствующие обратимые комплексы; E' — алкилированный фермент; k_{II}' и k_{II}'' — бимолекулярные константы скорости ингибирования ионами азиридиния соответственно в отсутствие и в присутствии Q; P — продукт реакции. Схеме (III) соответствует уравнение

$$\frac{d[E']}{dt} = \frac{k_{II}'[E]}{1 + [Q]/K_Q} + \frac{k_{II}''[E] \frac{[Q]}{K_Q}}{1 + [Q]/K_Q} = k_{II(\text{каж})}[E],$$

где $k_{II(\text{каж})}$ — экспериментальная константа скорости ингибирования фермента ионами азиридиния в присутствии данной [Q]. Если $k_{II}''/k_{II}' = \beta$, то

$$k_{II(\text{каж})} = k_{II}' \frac{1 + \beta [Q]/K_Q}{1 + [Q]/K_Q}. \quad (3)$$

При связывании ионов ТЭА с тем же участком, с которым связываются ионы азиридиния, образуются обратимые комплексы только двух типов: EI и EQ. Образование же тройного комплекса EQI исключается, и $\beta = 0$. В этом случае наблюдается полная конкурентная защита холинэстераз ионами ТЭА от ингибирования производными азиридиния и, следовательно,

$$k_{II(\text{каж})} = \frac{k_{II}'}{1 + [Q]/K_Q}.$$

Защитный эффект ионов ТЭА для этого случая может быть оценен величиной

$$\frac{1}{1 + [Q]/K_Q} = k_{II(\text{каж})}/k_{II}'.$$

Расчеты показывают (табл. 4), что для систем ацетилхолинэстераза — ДНФА — ТЭА, бутирилхолинэстераза — ДНФА — ТЭА и пропионилхолинэстераза — ДФА — ТЭА $\frac{1}{1 + [Q]/K_Q}$ значительно ниже полученного в эксперименте отношения $k_{II(\text{каж})}/k_{II}'$. Следовательно, защитный эффект ТЭА не соответствует полному конкурентному связыванию.

Неполнота защиты холинэстераз ионами ТЭА от взаимодействия с производными азиридиния и особенно наличие эффекта активации в реакции ингибирования пропионилхолинэстеразы ДНФА значительно лучше укладываются в схему неконкурентного связывания ионов ТЭА. В этом случае обратимый комплекс EQ не является тупиковым, а способен связывать I с образованием тройного комплекса EQI, превращающегося в дальнейшем в алкилированный фермент, т. е. $\beta \neq 0$. Если $1 > \beta > 0$, то имеет место неполный защитный эффект, а при $\beta > 1$ наблюдается активация. Согласно схеме неконкурентного связывания ТЭА, по уравнению (3) рассчитывали величину β . Для защитного эффекта ТЭА β действительно больше 0 и составляет для ацетилхолинэстеразы 0,372, бутирилхолинэстеразы — 0,375 и пропионилхолинэстеразы — 0,56. Для активирующего действия ТЭА $\beta = 3,72$, т. е. значительно больше 1. Интересно, что величины β близки или практически совпадают с экспериментальной величиной $k_{II(\text{каж})}/k_{II}'$; следовательно, при $[TЭА] \gg K_I$ $k_{II(\text{каж})} \rightarrow k_{II}'$.

Активирующий эффект ТЭА в реакции пропионилхолинэстеразы с ДНФА исследовали более подробно в зависимости от концентрации ТЭА. Зависимость активирующего действия ТЭА от концентрации активатора представляет интерес для расчета K_Q — равновесной константы активации ионов ТЭА в системе пропионилхолинэстераза — ДНФА — ТЭА. Для этого уравнение (3) преобразовывали в линейную форму:

$$\left(\frac{k_{II(\text{каж})}}{k_{II}'} - 1 \right)^{-1} = \frac{K_Q}{\beta - 1} \cdot \frac{1}{[Q]} + \frac{1}{\beta - 1}$$

Таблица 5
 Константы неконкурентного связывания ДФА и ДНФА
 с холинэстеразами

Фермент	Алкилирующий агент	$K_i' = K_i/\alpha'$, М
Ацетилхолинэстераза	ДФА	$3,3 \cdot 10^{-5}$
	ДНФА	$5,9 \cdot 10^{-4}$
Бутирилхолинэстераза	ДФА	$5,6 \cdot 10^{-4}$
	ДНФА	$3,1 \cdot 10^{-3}$
Пропионилхолинэстераза	ДФА	$1,2 \cdot 10^{-3}$
	ДНФА	$3,2 \cdot 10^{-2}$

и величину K_Q определяли графически из зависимости $(k_{II(\text{наж})}/k_{II}' - 1)^{-1}$ от $1/[Q]$ по $\text{tg } \alpha$ наклона прямой (рис. 5). Из этой же зависимости по отрезку, отсекаемому на оси ординат, определяли величину β . Зависимость $(k_{II(\text{наж})}/k_{II}' - 1)^{-1}$ от $1/[Q]$ отклонялась от линейной, давая загиб книзу в области низких концентраций ТЭА. Для [ТЭА] $\sim 5 \cdot 10^{-3} - 2,5 \cdot 10^{-2}$ М, соответствующих прямолинейному участку зависимости, величина константы обратной сорбции ТЭА, ответственной за активацию, составляет $\sim 3 \cdot 10^{-3}$ М, т. е. значительно выше константы конкурентного связывания ТЭА и практически совпадает с константой неконкурентного обратимого связывания ТЭА ($K_Q' = K_Q/\alpha'$) с активной поверхностью пропионилхолинэстеразы, а $\beta \sim 4,0 - 5,0$. В области низких концентраций ТЭА, когда осуществляется преимущественно конкурентная сорбция ТЭА по аннионному участку активного центра, равновесная константа обратной сорбции ТЭА на пропионилхолинэстеразе снижается при одновременном снижении и эффекта активации, оцениваемого величиной β .

Таким образом, модификация каталитических свойств холинэстераз наблюдается только для одного типа фермента — ацетилхолинэстеразы при алкилировании только незамещенным азиридином — ДФА. Модифицирующее действие ДФА на каталитическую активность ацетилхолинэстеразы коррелирует с высокой неконкурентной частью в обратимом связывании ДФА с ацетилхолинэстеразой, с низкими величинами K_{ir} для этого агента и высокими величинами $k_{II,0}$. При введении нитрозаместителя в фенильное кольцо K_{ir} алкилирующего агента по отношению к ацетилхолинэстеразе увеличиваются, снижается необратимое ингибирование гидролиза АХ, уменьшается неконкурентный компонент в обратимом торможении и одновременно утрачивается способность агента модифицировать каталитические свойства ацетилхолинэстеразы. Отсутствие модификации каталитических свойств холинэстераз при действии ДФА и ДНФА по отношению к бутирил- и пропионилхолинэстеразам коррелирует с аналогичными изменениями кинетических параметров: особенно четко выявляется снижение неконкурентного компонента в обратимом торможении этими агентами бутирил- и пропионилхолинэстераз по сравнению с ацетилхолинэстеразой. Наличие неконкурентного компонента в обратимом торможении ферментативного гидролиза АХ азиридиновыми ионами, неполнота защитного действия ТЭА на их реакцию необратимого связывания с холинэстеразами и особенно активирующее действие ТЭА на реакцию пропионилхолинэстеразы с ДНФА приводят к выводу, что ионы азиридиния, по-видимому, обратимо связывают и алкилируют не менее двух групп на активной поверхности холинэстераз. Одна из этих групп находится непосредственно в активном центре и является его аннионным участком, а другая располагается вне активного центра. Из величины α' , неконкурентного компонента в торможении, можно рассчитать сродство ДФА и ДНФА к группе, находящейся вне активного центра $K_i' = K_i/\alpha'$ (табл. 5).

Вероятно, алкилирование ионами азиридиния функциональной группы вне активного центра наиболее полно осуществляется в реакции ДФА с ацетилхолинэстеразой: K_1' на порядок ниже, чем для ДНФА. При взаимодействии с бутирилхолинэстеразой и особенно с пропионилхолинэстеразой величины K_1' для ДФА и ДНФА значительно повышаются. Для образования ацетилхолинэстеразы с модифицированными каталитическими свойствами большое значение имеет как полнота алкилирования функциональной группы вне активного центра, так и структура присоединяющегося при алкилировании остатка. Ацетилхолинэстераза, алкилированная паранитрозамещенным производным ДФА, не обладает способностью с высокой скоростью гидролизовать ИФА.

В ходе реакции ДФА с ацетилхолинэстеразой начальное падение скорости гидролиза ИФА обусловлено главным образом обратимым связыванием ДФА по анионной группе активного центра, а развивающееся вслед за этим во времени восстановление и активация скорости гидролиза ИФА являющаяся результатом алкилирования анионных групп в активном центре и вне его. Интересно, что константы скорости реакции ацетилхолинэстеразы с ДФА, определенные по активации гидролиза ИФА, несколько отличаются от констант, найденных из кинетики ингибирования гидролиза АХ: $k_{II,0}$ несколько ниже, а K_{II} несколько выше и совпадают с константой неконкурентного связывания ДФА — K_1' . Вероятно, обратимая сорбция ионов ДФА по анионному участку активного центра за счет стерического блокирования всего активного центра препятствует подходу и гидролизу как заряженных, так и незаряженных субстратов, а алкилирование анионных групп в активном центре и вне его сопровождается конформационными изменениями в области каталитического центра, благоприятными для подхода и гидролиза незаряженного субстрата ИФА. Взаимодействие катионных субстратов и ингибиторов с алкилированным активным центром происходить не может из-за возможного протонирования диметиламиногруппы остатка ДФА, связанного с анионным участком и электростатического отталкивания вследствие этого катионных соединений.

Поскольку этилениммониевые ионы не обладают абсолютной специфичностью по отношению к COOH -группам, второй алкилируемой группой ацетилхолинэстеразы могут быть —SH, —OH и NH_2 -группы или азот имидазольного кольца гистидина. В конце 60-х годов на основании особенностей в кинетике обратимого ингибирования холинэстераз бисчетвертными соединениями было высказано предположение о наличии на активной поверхности ацетилхолинэстеразы, помимо анионного участка активного центра, анионных участков, осуществляющих аллостерическую регуляцию каталитического центра [17, 18]. В настоящее время это предположение подтверждено методами флуоресцентной и спин-резонансной спектроскопии [19, 20]. Симметричный динитроксидный аналог декаметона связывается с ацетилхолинэстеразой из электрического органа ската по двум различным участкам, один из которых является анионным участком активного центра, а другой представляет собой периферический регуляторный участок [20]. Наличие периферических анионных участков предполагается также и на активной поверхности других холинэстераз, например бутирилхолинэстеразы [12]. Возможно, что вторым алкилируемым ионами азиридиния участком являются периферические анионные участки холинэстераз, выполняющие регуляторную функцию.

Кинетика взаимодействия ионов азиридиния с холинэстеразами согласуется с наличием в этом процессе промежуточной ассоциативной стадии, играющей большую роль в необратимом взаимодействии с ферментом. $k_{II,0}$ скорости необратимого взаимодействия ДФА и ДНФА с ацетил- и бутирилхолинэстеразами, коррелируют не с алкилирующей способностью этих агентов (qk_2), а с их обратимой сорбцией на соответствующих участках фермента. Снижение $k_{II,0}$ по отношению к ацетил- и бутирилхо-

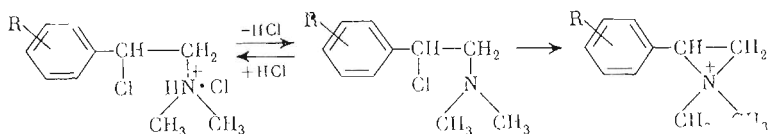
линэстеразам связано с уменьшением сорбционной способности пнтрозамещенного ДФА на участках фермента, содержащих реакционноспособные группы, что выражается в повышении величин K_{ir} . В случае пропионилхолинэстеразы такая корреляция отсутствует: при введении нитрогруппы $k_{II,0}$ увеличивается при одновременном увеличении K_{ir} . Возможно, что ДНФА при взаимодействии с пропионилхолинэстеразой алкилирует не карбоксильную группу анионного центра, а функциональную группу в эстеразном центре — гидроксил серина или азот амидазола. В пользу этого предположения свидетельствует то, что обратимая сорбция ДНФА практически полностью конкурентна по отношению к АХ, т. е. происходит исключительно по активному центру пропионилхолинэстеразы. Алкилирование с помощью ДНФА гидроксила серина в эстеразном центре дает возможность объяснить и необычный факт активирующего действия ионов ТЭА на необратимое ингибирование пропионилхолинэстеразы ДНФА. Константа активации ТЭА, определенная в реакции ДНФА с пропионилхолинэстеразой, совпадает с константой его неконкурентного связывания K_i' ($K_Q = K_i' = K_i/\alpha'$), из чего следует, что при образовании тройного EQI-комплекса местом сорбции ТЭА, по-видимому, является периферический регуляторный участок пропионилхолинэстеразы, а местом сорбции ДНФА — каталитический центр.

Известно, что ТЭА, как катионный обратимый ингибитор холинэстераз, обладает сложным типом действия: помимо обратимого ингибирующего действия, обусловленного ионной сорбцией по анионному участку активного центра, ТЭА обладает выраженным активирующим действием на реакцию метансульфонилирования и карбамилирования, протекающие на эстеразном участке [21, 22]. По-видимому, и в случае пропионилхолинэстеразы ТЭА, сорбируясь конкурентно по анионному участку или неконкурентно по аллостерическому участку, активирует реакцию необратимого связывания гидроксила серина с ДНФА за счет изменения конформации эстеразного центра.

Экспериментальная часть

Использовали частично очищенные продажные препараты ацетил-, бутирил- и пропионилхолинэстераз производства Пермского научно-исследовательского института вакцин и сывороток.

Для получения активной циклической формы ДФА и ДНФА соответствующие свободные основания — N,N-диметил-2-фенил-2-хлорэтиламин и N,N-диметил-2-п-нитрофенил-2-хлорэтиламин растворяли в водной среде с рН 7,5 при добавлении эквимолярного количества NaOH:



Известно, что образование циклического иона ДФА из свободного основания в этих условиях происходит практически мгновенно [3, 5]. Скорость циклизации других 2-галогидоалкилэтиламинов зависит от электроположительности алкила [23], поэтому специально исследовали образование циклической формы ДНФА из свободного основания в зависимости от рН (рис. 6). При рН 6 циклизация происходит медленно, при рН 7,5 значительно ускоряется. Оптимальным рН, так же как и для циклизации ДФА, был рН 7,5. Циклическая форма ДФА при данном рН достаточно стабильна и не гидролизуетя по крайней мере в течение 2 ч.

Обратимое ингибирование оценивали по величинам ингибиторных констант K_i , которые определяли в стандартных условиях: 0,1 М КСl, 0,0067 М

фосфатный буфер, рН 7,5; 25°. Сначала исследовали зависимость скорости ферментативного гидролиза от концентрации АХ в отсутствие ингибитора (I), а затем при 4—5 различных концентрациях I. Диапазон концентраций АХ был следующим: $3,5 \cdot 10^{-5}$ — $2 \cdot 10^{-4}$ М для ацетилхолинэстеразы; $3,5 \cdot 10^{-4}$ — $2 \cdot 10^{-3}$ М для бутирилхолинэстеразы и $3,5 \cdot 10^{-5}$ — $2 \cdot 10^{-4}$ М для пропионилхолинэстеразы. Расчет K_i и идентификацию типа обратимого ингибирования производили графическими методами Диксона и Лайнуивера — Берка [12].

Для оценки необратимого ингибирования экспериментально определяли бимолекулярные константы скорости взаимодействия ингибиторов с ферментами

$$k_{II, \infty} = \frac{2,3}{[I] \cdot t} \cdot \lg \frac{v_0}{v_t},$$

где v_0 — начальная скорость гидролиза субстрата, а v_t — скорость гидролиза субстрата к моменту t , времени взаимодействия фермента с I. Ферменты в концентрациях 2 (ацетилхолинэстераза), 0,6 (бутирилхолинэстераза) и 0,012 мг/мл (пропионилхолинэстераза) инкубировали 2—3 ч с I в стандартных условиях и через определенные интервалы времени из инкубационной смеси отбирали пробы для установления v_t . v_0 и v_t находили для двух различных субстратов, АХ и ИФА, используя их в концентрациях, близких к оптимальным для каждого типа фермента. $k_{II, \infty}$ для каждого фермента и ингибитора определяли при 4—5 различных [I]. При исследовании влияния ионов ТЭА на необратимое ингибирование холинэстераз ионами ДФА и ДНФА в инкубационную смесь добавляли ТЭА в различных концентрациях.

Скорости гидролиза АХ определяли методом потенциометрического титрования при постоянстве рН и [АХ] [12]. Пробы титровали 0,0195 н. раствором NaOH с использованием стеклянного электрода и высокочувствительного рН-метра рН-262.

Скорости гидролиза ИФА определяли спектрофотометрически на приборе ФЭК-60 с использованием светофильтра с λ_{\max} 590 нм при рН 8 в 0,027 М фосфатном буфере.

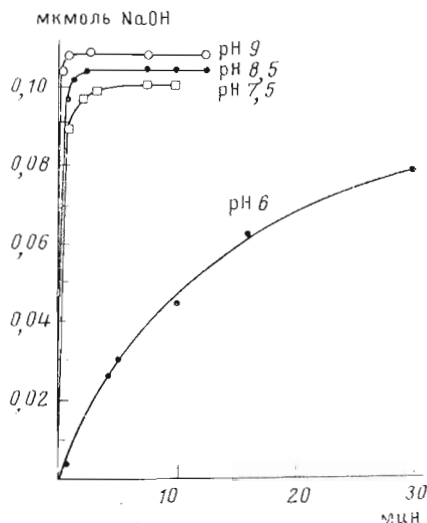


Рис. 6. Зависимость скорости циклизации N,N-диметил-2-n-нитрофенил-β-хлорэтиламина от рН (t 25°, [I] = $1 \cdot 10^{-2}$ М)

ЛИТЕРАТУРА

1. Shaw E. (1970) in *The Enzymes*, vol. 1, pp. 91—146 (P. D. Boyer, ed.), Acad. Press, N. Y.—London.
2. Goodlad G. A. I. (1957) *Biochim. et biophys. acta*, **24**, 645—651.
3. Belleau V., Tani H. (1966) *Mol. Pharmacol.*, **2**, 411—423.
4. Purdie J. E., McIvor R. A. (1966) *Biochim. et biophys. acta*, **128**, 590—594.
5. Purdie J. E. (1969) *Biochim. et biophys. acta*, **185**, 122—133.
6. Belleau V., Di Tullio V. (1971) *Can. J. Biochem.*, **49**, 1131—1133.
7. Beddoe F., Smith H. B. (1971) *J. Pharm. and Pharmacol.*, **23**, 37—49.
8. Lalka D., Bardos T. I. (1975) *Biochem. Pharmacol.*, **24**, 455—461.
9. Бресткин А. П., Волкова Р. И., Годовиков Н. Н., Кабачник М. И. (1968) *Изв. АН СССР. Сер. хим.*, № 9, 2028—2032.
10. Бресткин А. П., Брик И. Л., Волкова Р. И., Майзель Е. Б., Розенгарт Е. В. (1970) *Биохимия*, **35**, 382—393.
11. Соболева И. Н., Самокиш В. А., Розенгарт Е. В. (1969) *Биохимия*, **34**, 1173—1177.
12. Волкова Р. И., Дмитриева Е. Н. (1976) *Биохимия*, **41**, 443—451.
13. Бресткин А. П., Брик И. Л., Волкова Р. И., Годовиков Н. Н., Гурдалнев Х. Х., Кабачник М. И., Кафдалов Н. А. (1971) *Докл. АН СССР*, **200**, 103—106.

14. Волкова Р. И., Бресткин А. П., Годовиков Н. Н., Дмитриева Е. Н., Ножко Т. Н. (1972) Всесоюзн. конф. по химии фосфорорг. соединений, с. 48—50, М.
15. Main A. R. (1969) Can. Med. Associat. J., **100**, 161—167.
16. O'Brien R. D. (1969) Biochem. J., **113**, 713—719.
17. Changeux J. P. (1966) Mol. Pharmacol., **2**, 369—374.
18. Волкова Р. И. (1968) Биохимия, **33**, 604—611.
19. Taylor P., Lwebuda-Mukasa J., Berman H., Lappi S. (1975) Croatica Chemica Acta, **47**, 251—263.
20. Wee V. T., Sinka B. K., Taylor P. W., Chignell C. E. (1976) Mol. Pharmacol., **12**, 667—677.
21. Wilson I. B. (1971) in Cholinergic Ligand Interactions (D. J. Triggle, I. F. Moran, E. A. Barnard, eds.), pp. 1—18, Acad. Press, N. Y.
22. Iverson F. (1974) Mol. Pharmacol., **7**, 129—135.
23. Kimelberg H., Triggle D. I. (1965) J. Theoret. Biol., **9**, 313—317.

Поступила в редакцию
24.III.1977

**ALKYLATION OF CHOLINESTERASES
WITH N,N-DIMETHYL-2-PHENYLAZIRIDIUM
AND N,N-DIMETHYL-2-p-NITROPHENYLAZIRIDIUM IONS**

VOLKOVA R. I., KOCHETOVA L. M.

*I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Leningrad*

The reaction kinetics of acetylcholinesterase (AChE, EC.3.1.1.7), butyrylcholinesterase (BChE, EC 3.1.1.8) and propionylcholinesterase (PChE, EC 3.1.1.8) with N,N-dimethyl-2-phenylaziridinium (DPA) and N,N-dimethyl-2-p-nitrophenylaziridinium (DNPA) reveal the presence of the reversible association stage. AChE and BChE bimolecular reaction rate constants (k_{II}) with DPA ($4.6 \cdot 10^2$ and $93 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) are significantly higher as compared with those for DNPA (10.5 and $5.3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$). On the contrary k_{II} for PChE reaction with DPA ($20 \text{ M}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) is two times lower than that with DNPA. With AChE and BChE there is a correlation of k_{II} with K_{ir} and K_i values which characterize reversible binding of aziridinium ions. The experimental qk_2 values relevant to the alkylation stage show no correlation with k_{II} and are of 10^{-2} min^{-1} magnitude for all the enzymes under study. Only AChE alkylated with DPA possessed modified catalytic properties, namely it lost the ability to hydrolyze acetylcholine (ACh) but acquired that for hydrolysis of uncharged substrate, indophenylacetate, at a higher rate. Tetraethylammonium ions exerted a protective effect in the reaction of DPA with both AChE and BChE, and showed an activating effect in the DNPA reaction with PChE. As DPA and DNPA reversible inhibition of AChE and BChE-catalyzed hydrolysis of ACh has a high non-competitive contribution, a suggestion was made that aziridinium ions can reversibly bind and alkylate both the anionic site in the catalytic center of the enzyme, and the periferal anionic sites of the allosteric regulatory center.