



УДК 577.152.0.2

КОНСТАНТА ДИССОЦИАЦИИ АНИОННОГО ЦЕНТРА БУТИРИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ

Лангель Ю. Л., Яров Я. Л.

Тартуский государственный университет, Тарту, ЭССР

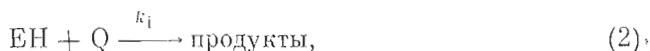
Измерены бимолекулярные константы скорости ингибирования бутирилхолинэстеразы (КФ 3.1.1.8) фосфорорганическими ингибиторами $(C_2H_5O)_2P(O)SX$ с $X = (CH_2)_3S^+(CH_3)C_2H_5$, $(CH_2)_3SC_2H_5$ и C_6H_{13} в интервале значений pH 3—11 в 0,15 и 2,5 М KCl при 25°. Показано, что в реакции фермента с неионными ингибиторами проявляются две ионогенные группы. В случае катионного реагента реакция ингибирования контролируется тремя функциональными группами, одна из которых принадлежит, по-видимому, анионному центру фермента. Полученные результаты хорошо согласуются с представлением, что ионогенной группой анионного центра является боковая карбоксильная группа аспарагиновой или глутаминовой кислоты.

Реакцию бутирилхолинэстеразы с неионными субстратами [1—3] и ингибиторами [3—5] контролируют две ионогенные группы активного центра фермента, ионизация которых описывается схемой



где EH — активная форма фермента. Возможно, что обе эти группы входят в состав каталитического центра фермента. Кроме того, предполагают, что в реакции бутирилхолинэстеразы с катионными субстратами и ингибиторами участвует так называемый анионный центр, ответственный за специфическое связывание катионных реагентов на активной поверхности фермента [1—3, 5, 7]. При этом можно ожидать, что реакцию бутирилхолинэстеразы с катионными реагентами контролируют не две, а три ионогенные группы активного центра, так как изменение степени ионизации функциональной группы анионного центра также должно проявляться в кинетике ферментативной реакции.

Таким образом, в закономерностях влияния pH на кинетику реакций бутирилхолинэстеразы с катионными и неионными реагентами можно ожидать различий, позволяющих оценивать константу ионизации ионогенной группы анионного центра фермента. С целью экспериментальной проверки этого предположения в данной работе изучено влияние pH на бимолекулярную константу скорости реакции бутирилхолинэстеразы с катионным фосфорорганическим ингибитором $[(C_2H_5O)_2P(O)S(CH_2)_3 \cdot S(CH_3)C_2H_5]CH_3SO_4^-$ и его незаряженными структурными аналогами $(C_2H_5O)_2P(O)S(CH_2)_3SC_2H_5$ и $(C_2H_5O)_2P(O)SC_6H_{13}$, которые необратимо взаимодействуют с ферментом согласно схеме [7,8]:



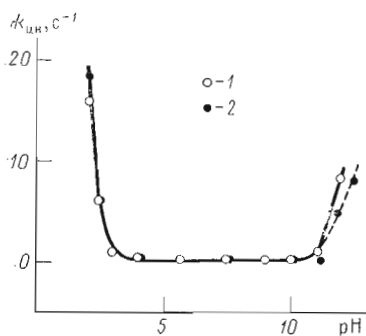


Рис. 1

Рис. 1. Зависимость скорости спонтанной инактивации бутирилхолинэстеразы от pH реакционной среды в 0,15 (1) и 2,5 М KCl (2)

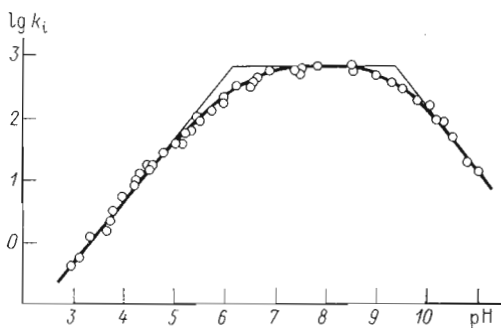


Рис. 2

Рис. 2. Реакция бутирилхолинэстеразы с фосфорорганическим ингибитором $(C_2H_5O)_2P(O)S(CH_2)_3SC_2H_5$ в 0,15 М KCl

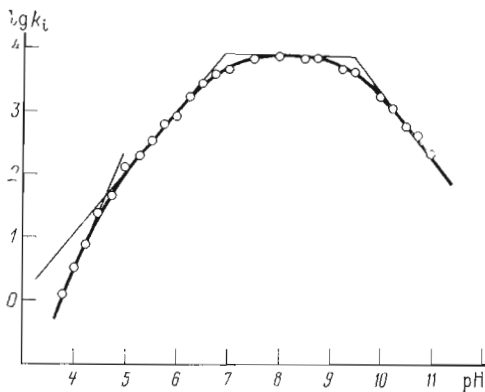


Рис. 3

Рис. 3. Реакция бутирилхолинэстеразы с фосфорорганическим ингибитором $[(C_2H_5O)_2P(O)S(CH_2)_3S^+(CH_3)-C_2H_5]CH_3SO_4^-$ в 0,15 М растворе KCl

где ЕН — активная форма фермента и Q — ингибитор. Опыты проводились в 0,15 и 2,5 М растворах KCl в максимально широком интервале измерения pH раствора.

Предварительные опыты показали, что стабильность используемого препарата бутирилхолинэстеразы уменьшается в щелочной и кислой средах. При этом процесс инактивации фермента может быть описан до 50%-ной глубины превращения кинетическим уравнением реакции первого порядка, что допускало определение констант скорости спонтанной инактивации фермента $k_{ин}$. Из зависимости $k_{ин}$ от pH (рис. 1) видно, что сильное уменьшение стабильности фермента наблюдается при значениях pH ниже 3 и выше 11, чем и определяются пределы интервала изменения pH при измерении кинетики ингибирования бутирилхолинэстеразы.

Зависимость $lg k_i$ от pH в реакции неонного ингибитора $(C_2H_5O)_2P(O)S(CH_2)_3SC_2H_5$ с бутирилхолинэстеразой (рис. 2) имеет симметричную форму, и наклоны прямолинейных участков этой кривой соответствуют теоретическим значениям +1, 0 и -1. Это означает, что полученные экспериментальные данные согласуются по всему интервалу изменения pH среды со схемой (1) и могут быть описаны уравнением

$$lg k_i = lg k_i^{lim} - lg \left(1 + \frac{K_1}{[H^+]} + \frac{[H^+]}{K_2} \right), \quad (3)$$

где k_i^{lim} — независимая от pH константа скорости, K_1 и K_2 характеризуют диссоциацию функциональных групп активного центра свободного фермента. Теми же закономерностями характеризуются данные для второго неонного ингибитора $(C_2H_5O)_2P(O)SC_6H_{13}$. Расчет величин $lg k_i^{lim}$, pK_1 и pK_2 проводился согласно уравнению (3) методом Уилкинсона [10], полученные результаты и их погрешности приведены в таблице.

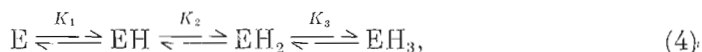
Результаты анализа рН-зависимости бимолекулярной константы ингибирования
бутирилхолинэстеразы фосфорорганическими ингибиторами $(C_2H_5O)_2P(O)SX$
при 25,0°

X	Концен- трация KCl, M	pK_1	pK_2	pK_3	$\lg k_i^{lim}$	Интер- вал рН	n *
$(CH_2)_3SC_2H_5$	0,15	$9,47 \pm 0,10$	$6,20 \pm 0,11$	—	$2,75 \pm 0,05$	3—11	45
	2,50	$9,18 \pm 0,06$	$6,54 \pm 0,06$	—	$3,00 \pm 0,03$	4,5—10,5	15
C_6H_{13}	0,15	$9,49 \pm 0,06$	$6,30 \pm 0,07$	—	$2,78 \pm 0,03$	4,5—11	22
	2,50	$9,14 \pm 0,06$	$6,60 \pm 0,07$	—	$3,04 \pm 0,05$	5—10	14
$(CH_2)_3\overset{+}{S}(CH_3)C_2H_5$	0,15	$9,46 \pm 0,08$	$6,70 \pm 0,23$	$4,50 \pm 0,12$	$3,95 \pm 0,09$	3,5—11	25
	2,50	$9,10 \pm 0,12$	$6,43 \pm 0,19$	$5,09 \pm 0,14$	$2,79 \pm 0,09$	3,5—10,5	26

* Число экспериментальных точек.

В отличие от неионных соединений зависимость $\lg k_i$ от рН в реакции бутирилхолинэстеразы с катионным ингибитором

$[(C_2H_5O)_2P(O)S(CH_2)_3\overset{+}{S}(CH_3)C_2H_5] CH_3SO_4^-$ не имеет симметричной формы, так как левая ветвь полученной кривой круче правой (рис. 3). Наклоны прямолинейных участков этой зависимости равны +2, +1, 0 и -1, что соответствует схеме



учитывающей две ступени протонирования активной формы фермента EH . При этом зависимость $\lg k_i$ от концентрации водородных ионов определяется уравнением

$$\lg k_i = \lg k_i^{lim} - \lg \left(1 + \frac{K_1}{[H^+]} + \frac{[H^+]}{K_2} + \frac{[H^+]^2}{K_3 K_2} \right). \quad (5)$$

Проведенная на рис. 3 через экспериментальные точки теоретическая кривая вычислена по этому уравнению с использованием параметров $\lg k_i^{lim}$, pK_1 , pK_2 и pK_3 , полученных методом Уилкинсона (см. таблицу). Аналогичная зависимость $\lg k_i$ от рН, допускающая определение констант ионизации трех ионогенных групп, получена также в реакции сульфониевого ингибитора с ферментом в 2,5 М КСl.

Таким образом, экспериментальные данные согласуются с вышеприведенными соображениями об участии в реакции бутирилхолинэстеразы с катионными реагентами трех ионогенных групп. Из таблицы видно, что все три константы K_1 , K_2 и K_3 достаточно отличаются друг от друга и могут быть приравнены к истинным константам диссоциации кислотных форм отдельных функциональных групп активного центра фермента [9]. При этом характеризуемая константой K_1 группа участвует в катализе в протонированной форме (кислотная группа), тогда как характеризуемые константами K_2 и K_3 группы активны в форме основания.

Полученные для реакции бутирилхолинэстеразы с диэтилтиофосфатами значения pK_1 и pK_2 достаточно хорошо согласуются с литературными данными для реакции этого фермента с субстратами (значения pK 9,0 и 6,4 [1]; 9,0 и 6,2 [2]), фосфорорганическими ингибиторами различного строения (9,7 и 6,4—6,5 [5]; ~9,4 и 6,6 [4]) и метансульфофторидом (pK_1 10,1 и pK_2 6,2 [6]). При определении этих величин были использованы реакционные среды различного состава и разной ионной силы. Как видно из таблицы, изменение ионной силы среды действует на ионизацию всех трех ионогенных групп бутирилхолинэстеразы, что следует также учитывать при сопоставлении результатов разных работ. Отсутствие системати-

ческих данных, однако, не позволяет более подробно охарактеризовать эту зависимость, которая в принципе может служить дополнительным источником информации о природе ионогенных групп. Следует также отметить, что во всех вышеприведенных работах измерение кинетики проводилось при $\text{pH} > 5-5,5$, что не позволило обнаружить изменение степени ионизации активного центра фермента в более кислой среде.

Из приведенных в таблице результатов можно сделать вывод, что изменение степени ионизации анионного центра бутирилхолинэстеразы выражается равновесием между формами фермента EH_2 и EH_3 и характеризуется константой K_3 . Полученное значение для K_3 хорошо согласуется с константами диссоциации боковых карбоксильных групп аспарагиновой и глутаминовой кислот, которые естественно представить в роли функциональной группы анионного центра бутирилхолинэстеразы [5, 8]. Для карбоксильных групп этих аминокислот в разных белках получены значения $\text{p}K_a$ от 3 до 4,7 [9], и свободные аспарагиновая и глутаминовая кислоты имеют $\text{p}K_a$ 3,9 и 4,5 [11] соответственно.

Каталитическая группа, участвующая в ферментативной реакции в виде основания, по-видимому, имидазольный остаток гистидина. Для этой группы приводятся значения $\text{p}K_2$ в разных белках от 5,6 до 7 [9], что согласуется с имеющимися для бутирилхолинэстеразы экспериментальными данными. При протонизации этой основной группы (или, точнее, серин-гистидиновой пары) фермент теряет активность в реакциях как с катионным, так и с неионными ингибиторами. Из таблицы видно, что полученное при одинаковых условиях эксперимента для этой стадии ионизации значение $\text{p}K_2$ практически не зависит от природы реагента. Несколько большее отклонение наблюдается в случае сульфониевого ингибитора в 0,15 M KCl, однако при этом важно также учесть, что определение K_2 в уравнении (5) характеризуется наибольшей погрешностью.

Изменение степени ионизации активного центра бутирилхолинэстеразы в щелочной среде обычно связывают с диссоциацией гидроксильной группы остатка тирозина (см. [2, 6, 8]), для которой приведен возможный интервал значения $\text{p}K_a$ в белках от 9,8 до 10,4 [9]. Роль этой кислотной группы в катализе, однако, не выяснена.

Таким образом, полученные в настоящей работе результаты согласуются с имеющимися представлениями о строении активного центра бутирилхолинэстеразы и дополняют их определением константы диссоциации функциональной группы анионного центра. При этом эффективность связывания с ферментом алкиламмониевых ионов, которые являются обратимыми ингибиторами бутирилхолинэстеразы и предположительно взаимодействуют с анионным центром фермента, контролируется также группой с $\text{p}K_a$ 6,2 [1, 2], а не функциональной группой анионного центра. Такое одинаковое влияние pH среды на скорость гидролиза неионных субстратов и на эффективность ингибирования алкиламмониевыми ингибиторами холинэстераз обсуждалось в работе Бергмана и соавт. [2]. В этой работе было высказано предположение, что уменьшение ингибиторной активности алкиламмониевых ионов при $\text{pH} < 7$ связано с нейтрализацией эффективного заряда анионного центра в результате протонизации основной каталитической группы с $\text{p}K_a$ 6,2 (имидазол), которая находится рядом с ионогенной группой анионного центра фермента. Такая же модель обсуждалась в случае ацетилхолинэстеразы в работе Крупки [12]. Можно ожидать, что нейтрализация эффективного заряда анионного центра не влияет на способность фермента связывать неионные реагенты.

С другой стороны, однако, также возможно, что образование ионной пары с участием имидазольного иона и ионной группы анионного центра сопровождается конформационным изменением активного центра фермента, необходимым для сближения этих ионов. При этом естественно предположить, что изменение pH раствора влияет также на эффективность связывания неионных реагентов с ферментом. В связи с этим представляет

интерес исследование влияния рН реакционной среды отдельно на стадии связывания и реакции в бутирилхолинэстеразном катализе. Работа в этом направлении нами продолжается.

Экспериментальная часть

В работе использовался препарат бутирилхолинэстеразы сыворотки крови лошади (КФ 3.1.1.8) производства Московского научно-исследовательского института вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова с уд. акт. 2,3 мкмоль/мин·мл (рН 7,5; 0,15 М КСl; 0,012 М бутирилхолиндиодид). Запасные растворы фермента с концентрацией активных центров 1 мкМ изготовлялись в 0,15 М КСl и хранились при 4°. Синтез и свойства фосфорорганических ингибиторов $[(C_2H_5O)_2P(O)S(CH_2)_3\overset{\dagger}{S}(CH_3)C_2H_5]CH_3SO_4^-$, $(C_2H_5O)_2P(O)S(CH_2)_3SC_2H_5$ и $(C_2H_5O)_2P(O)SC_6H_{13}$ описаны ранее [13]. Исходные растворы ингибиторов приготавливались в 0,15 и 2,5 М КСl, концентрация этих растворов и чистота препаратов ингибиторов проверялись как описано в работе [14]. Все растворы приготавливались в свежей бидистиллированной воде. Остальные реактивы — бутирилхолин иодистый марки х.ч., КОН и КСl — ос.ч. Стандартные буферные растворы для калибровки рН-метра приготавливались по таблице [15] и согласно предписанию фирмы Radiometer (Дания).

Кинетика ингибирования бутирилхолинэстеразы измерялась по уменьшению активности фермента в псевдомономолекулярных условиях при избытке ингибитора. Реакции ингибирования фермента проводились в термостатированной при 25° ячейке рН-стата (рН-121; БАТ-15; Б-701, СССР) в интервале рН 3—11 в 0,15 и 2,5 М растворах КСl. Предварительно в ячейке термостатировалось 5,0 мл раствора ингибитора и КСl, рН раствора доводили до нужного значения и прибавляли 0,05—0,2 мл запасного раствора фермента. Через различные промежутки времени из реакционной смеси отбирали пробы (0,05—0,2 мл) в ячейку другого рН-стата (ТТТ1; SBR2; АВU1, Radiometer, Дания) с 5,0 мл раствора 0,15 М КСl и 4 мМ бутирилхолиндиодида. Остаточная активность бутирилхолинэстеразы в этих пробах оценивалась по начальной скорости ферментативного гидролиза субстрата при рН 7,5 и 25° титрованием 0,01 М раствором КОН кислоты, образующейся при этой реакции. Опыты по исследованию стабильности фермента при разных рН проводились таким же способом без добавления ингибитора в реакционную смесь.

Псевдомономолекулярные константы ингибирования фермента k_i' (а также константы спонтанной инактивации фермента $k_{ин}$) рассчитывались из наклона зависимости $\ln v_t$ от t :

$$\ln v_t = \ln v_0 - k_i' t, \quad (6)$$

где v_t — скорость ферментативного гидролиза субстрата после реакции фермента с ингибитором в течение времени t ; v_0 — скорость гидролиза в тех же условиях без добавления ингибитора. Бимолекулярные константы скорости ингибирования бутирилхолинэстеразы k_i вычисляли путем деления величины k_i' на концентрацию ингибитора $[Q]$, что соответствует уравнению

$$k_i' = k_i [Q] + k_{ин} \quad (7)$$

при пренебрежимо малой по сравнению с $k_i [Q]$ константе скорости спонтанной инактивации фермента $k_{ин}$. Соблюдение этого условия было проверено во всем интервале изменения рН реакционной среды.

Для расчета искомых величин $\lg k_i^{lim}$ и pK_j ($j = 1-3$) ионогенных групп использовался метод последовательного уточнения заданных значений этих параметров при минимизации расхождения экспериментальной и теоретической зависимостей. Вводимые в подгоняемые параметры по-

правки $\Delta \lg k_i^{\text{lim}}$ и ΔpK_j и их погрешности рассчитывались методом многопараметровой корреляции из квазилинеаризированных форм уравнений (3) и (5):

$$\lg k_i - \psi = \Delta \lg k_i^{\text{lim}} \frac{\delta \psi}{\delta \lg k_i^{\text{lim}}} + \sum_{j=1}^m \Delta pK_j \frac{\delta \psi}{\delta pK_j}, \quad (8)$$

где $m = 2$ для уравнения (3) и $m = 3$ для уравнения (5). В этом выражении ψ обозначает соответствующую теоретическим уравнениям (3) и (5) функцию $\lg k_i$ от рН и искомых параметров $\lg k_i^{\text{lim}}$ и pK_j . Такой метод анализа рН-зависимости кинетических констант ферментативной реакции предложен в работе Уилкинсона [10]. Расчеты и статистическая обработка данных проводились на ЭВМ Наири-2.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bergmann F. (1955) *Disc. Faraday Soc.*, N 20, 126—133.
2. Bergmann F., Segal R., Shimoni A., Wurzel M. (1956) *Biochem. J.*, 63, 684—690.
3. Bergmann F. (1958) *Advances in Catal. and Relat. Subj.*, 10, 130—164.
4. Mounter L. A., Alexander H. C., Tuck K. D., Dien L. T. (1957) *Biochem. J.*, 226, 867—872.
5. Бресткин А. П., Брик Л. И., Волкова Р. И., Майзель Е. Б., Розенгарт Е. В. (1970) *Биохимия*, 35, 382—393.
6. Pavlič M. R. (1973) *Vestnik Slov. kem. društ.*, 20, 39—47.
7. Кабачник М. И., Абдувахабов А. А., Агабекова И. И., Бресткин А. П., Волкова Р. И., Годовиков Н. Н., Михайлов С. С., Михельсон М. Я., Розенгарт Е. В., Розенгарт Е. В., Ситкевич Р. В. (1970) *Успехи химии*, 39, 1050—1073.
8. Яковлев В. А. (1965) *Кинетика ферментативного катализа*, с. 202—237, «Наука», М.
9. Диксон М., Уэбб Э. (1966) *Ферменты*, с. 106—130, «Мир», М.
10. Wilkinson G. N. (1964) *Biochem. J.*, 80, 324—330.
11. *Справочник химика, часть III* (1964) с. 85—98, «Химия», М. — Л.
12. Krupka R. V. (1966) *Biochemistry*, 5, 1988—1998.
13. Ярв Я. Л., Аавиксаар А. А., Лобанов Д. И., Годовиков Н. Н. (1976) *Изв. АН СССР. Сер. хим.*, № 2, 426—428.
14. Ярв Я. Л., Аавиксаар А. А., Годовиков Н. Н., Лобанов Д. И. (1976) *Биоорганическая химия*, 2, 978—985.
15. Горновский И. Т., Назаренко Ю. П., Некряч Е. Ф. (1974) *Краткий справочник по химии*, с. 358, «Наукова думка», Киев.

Поступила в редакцию
22.III.1978.

DISSOCIATION CONSTANT OF BUTYRYLCHOLINESTERASE ANIONIC CENTER

LANGEL Ü., JÄRV J.

Tartu State University, Estonian SSR, Tartu

The second-order rate constants of butyrylcholinesterase (EC 3.1.1.8) reaction with organophosphorus inhibitors $(C_2H_5O)_2P(O)SX$, where $X = - (CH_2)_3\overset{\oplus}{S}(CH_3)C_2H_5$, $(CH_2)_3SC_2H_5$ and C_6H_{13} , have been determined over the pH range 3-11 in 0.15 M and 2.5 M KCl solutions. Two ionizable groups are involved in the reaction with non-ionic inhibitors, while three functional groups were found to operate upon enzyme inhibition with the cationic compound. The third ionizable group seems to belong to the enzyme anionic center. As inferred from the value of its dissociation constant, it may be the carboxyl group of aspartic or glutamic acid residues.