



УДК 577.153.04

ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ ИЗ ЭРИТРОЦИТОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА, МОДИФИЦИРОВАННОЙ ИОНАМИ N,N-ДИМЕТИЛ-2-ФЕНИЛАЗИРИДИНИЯ

Волкова Р. И., Кочетова Л. М.

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

Алкилирование ацетилхолинэстеразы ионами N,N-диметил-2-фенилазиридиния приводит к модификации каталитических свойств фермента: модифицированная ацетилхолинэстераза не гидролизует ацетилхолин; с более высокой скоростью, чем нативный фермент, гидролизует незаряженный субстрат индофенилацетат и утрачивает чувствительность к моночетвертичным и некоторым полиметиленбисчетвертичным обратимым ингибиторам, а также к катионной группе в отщепляющейся части фосфорорганических ингибиторов. Катионные соединения с объемными ароматическими радикалами (галантамин, панкуроний и др.) ингибируют модифицированный фермент, но значительно слабее, чем нативный. Модификация каталитических свойств сопровождается повышением термостабильности фермента и снижением стереоспецифичности в реакциях с энантиомерами фосфорорганических ингибиторов.

Обсуждается предположение, что модифицированная ацетилхолинэстераза является замороженной конформацией, моделирующей стадию начальной ионной сорбции нативным ферментом катионных субстратов и ингибиторов.

При исследовании кинетики взаимодействия двух аналогов азиридиния: N,N-диметил-2-фенилазиридиния (ДФА) и N,N-диметил-2-*n*-нитрофенилазиридиния с разными типами холинэстераз было показано [1], что только алкилирование ацетилхолинэстеразы из эритроцитов крови человека с помощью ДФА сопровождается модификацией каталитических свойств фермента. При алкилировании бутирилхолинэстеразы из сыворотки крови лошади и пропионилхолинэстеразы из мозговой ткани их каталитическая активность по отношению к ацетилхолину и неспецифическому субстрату индофенилацетату (ИФА) полностью утрачивается. Ацетилхолинэстераза из эритроцитов крови человека, модифицированная ионами ДФА, также практически теряет способность гидролизовать специфический субстрат АХ, в то время как незаряженный хромогенный субстрат ИФА гидролизруется ею со скоростью, значительно превосходящей скорость гидролиза ИФА под действием нативного фермента. Модификация каталитических свойств при алкилировании ДФА наблюдается также у ацетилхолинэстеразы из других источников: из эритроцитов быка [2, 3] и из электрического органа угря [4].

В литературе приводятся данные по исследованию свойств ацетилхолинэстеразы, модифицированной ионами ДФА: выявлены изменения в реакционной способности нативного и модифицированного фермента к ряду фосфорорганических ингибиторов и карбаматов, а также к небольшому числу обратимых ингибиторов [5]; показано, что при модификации полностью теряется способность фермента гидролизовать субстраты с чет-

Сокращения: ДФА — N,N-диметил-1-фенилазиридиний; ДНФА — N,N-диметил-2-*n*-нитрофенилазиридиний; АХ — ацетилхолин; ИФА — индофенилацетат.

вертикальным азотом (АХ и ацетилтиохолин) и изменяется активность по отношению к незаряженным эфирам уксусной кислоты [2].

Целью настоящей работы является более подробный анализ изменений, происходящих при модификации ацетилхолинэстеразы ионами ДФА. Представляет интерес исследование таких физических свойств, как термостабильность, а также изменения при модификации реакционной способности фермента по отношению к заряженным и незаряженным фосфорорганическим ингибиторам и к различным по структуре обратимым бискатионным ингибиторам.

При определении кинетических констант ферментативного гидролиза АХ и ИФА под действием частично (субстрат АХ) и полностью модифицированной ацетилхолинэстеразы (субстрат ИФА) выяснилось, что в гидролизе АХ участвует только немодифицированная часть фермента. Для частично модифицированного фермента величина K_m по отношению к АХ практически не меняется, происходит лишь снижение V за счет полной утраты частью фермента способности гидролизовать АХ. Для полностью модифицированного фермента, когда в качестве субстрата используется ИФА, K_m так же остается без изменений, а изменяется опять-таки максимальная скорость реакции V , повышаясь на 50—100% по сравнению с V для нативного фермента (табл. 1).

Уникальное свойство ацетилхолинэстеразы, модифицированной ионами ДФА, — со значительно более высокими скоростями, чем исходный фермент, гидролизовать незаряженный хромогенный субстрат ИФА — отмечалось в литературе [2—4], и предлагались различные объяснения этого феномена. Из полученных нами кинетических данных следует, что ионы ДФА связывают и алкилируют не менее двух групп на активной поверхности фермента и, по-видимому, активация ферментативного гидролиза ИФА является результатом алкилирования анионных групп в активном центре и вне его [1]. В то время как первоначальная обратимая

Таблица 1

Кинетические параметры гидролиза субстратов нативной и модифицированной ионами ДФА ацетилхолинэстеразой

Субстрат	Кинетический параметр	Нативный фермент	Модифицированный фермент
АХ (фермент модифицирован на 50%)	$K_m \cdot 10^4, M$	0,92±0,02	0,9±0,04
	$V \cdot 10^6, M \cdot mg^{-1} \cdot min^{-1}$	1,4±0,03	0,68±0,06
ИФА (фермент модифицирован на 100%)	$K_m \cdot 10^4, M$	8,7±0,4	8,9±0,3
	$V \cdot 10^6, M \cdot mg^{-1} \cdot min^{-1}$	1,5±0,3	2,9±0,7

Таблица 2

Влияние алкилирующих агентов на термостабильность холинэстераз (τ , мин)

Субстрат	Алкилирующий агент	Фермент		
		ацетилхолинэстераза (52°)	бутирилхолинэстераза (58°)	пропионилхолинэстераза (52°)
АХ	Без агента	14	28	2
	ДФА	16	24	1,5
	ДФФА	14	29	2
ИФА	Без агента	16	30	2
	ДФА	120	21	1,5
	ДФФА	19	25	2

Таблица 3

Действие различных обратимых ингибиторов на нативную и модифицированную ацетилхолинэстеразу

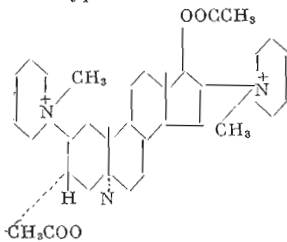
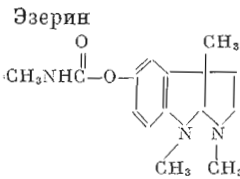
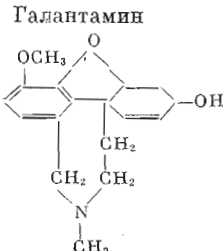
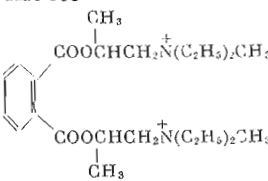
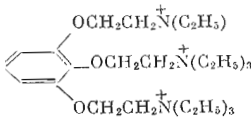
Ингибиторы	Концентрация ингибитора, М	Торможение ферментативного гидролиза ИФА, %	
		исходный фермент	модифицированный фермент
Ацетилхолин	$1 \cdot 10^{-4}$	$4,5 \pm 0,1$	0
	$5 \cdot 10^{-2}$	$83,0 \pm 0,1$	0
Тетраметиламмоний	$2 \cdot 10^{-3}$	$22,3 \pm 0,8$	0
	$3 \cdot 10^{-2}$	$57,0 \pm 1,2$	0
	$5 \cdot 10^{-2}$	$65,0 \pm 1,8$	0
Тетраэтиламмоний	$1 \cdot 10^{-4}$	$8,0 \pm 0,9$	0
	$2 \cdot 10^{-3}$	$23,0 \pm 0,4$	0
	$3,7 \cdot 10^{-1}$	100,0	0
Гексаметоний $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+(\text{CH}_2)_6\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	$1 \cdot 10^{-4}$	0	0
	$1 \cdot 10^{-3}$	$14,0 \pm 1,2$	0
	$1 \cdot 10^{-2}$	$30,4 \pm 2$	0
	$2,5 \cdot 10^{-2}$	—	0
Декаметоний $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+(\text{CH}_2)_{10}\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	$1 \cdot 10^{-4}$	$52,7 \pm 2,7$	0
	$7 \cdot 10^{-3}$	100,0	0
ИЭМ-840 $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+ \text{---} \text{C}_6\text{H}_4 \text{---} \text{C}_6\text{H}_4 \text{---} \text{C}_6\text{H}_4 \text{---} \text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	$1 \cdot 10^{-4}$	$70,0 \pm 4,5$	$5,0 \pm 1,1$
	$2,8 \cdot 10^{-4}$	$84,0 \pm 3,7$	$14,0 \pm 1,4$
ИЭМ-858 $(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N}^+ \text{---} \text{C}_6\text{H}_4 \text{---} \text{C}_6\text{H}_4 \text{---} \text{C}_6\text{H}_4 \text{---} \text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_3$	$1,7 \cdot 10^{-4}$	$85,0 \pm 2,8$	$18,3 \pm 0,7$
	$6 \cdot 10^{-4}$	100,0	$31,0 \pm 0,9$
Пажкуроний	$1 \cdot 10^{-4}$	$61,6 \pm 2,8$	$24,3 \pm 2,8$
	$1 \cdot 10^{-4}$	$89,2 \pm 3,2$	$38 \pm 2,8$
	$3,5 \cdot 10^{-4}$	100,0	$60 \pm 1,4$
	$1 \cdot 10^{-4}$	$89,2 \pm 3,2$	0
	$3,5 \cdot 10^{-4}$	100,0	$6,7 \pm 2,0$
Галантамин 	$1 \cdot 10^{-4}$	100,0	$52,0 \pm 2,7$
	$3,5 \cdot 10^{-4}$	100,0	$74,8 \pm 1,4$
	$4 \cdot 10^{-3}$	100,0	—
	$1,4 \cdot 10^{-2}$	100,0	—

Таблица 3 (окончание)

Ингибиторы	Концентрация ингибитора, М	Торможение ферментативного гидролиза ИФА, %	
		исходный фермент	модифицированный фермент
ПК 405 	$1 \cdot 10^{-4}$	28,6±2,6	0
	$1,5 \cdot 10^{-3}$	42,0±1,8	0
	$2,5 \cdot 10^{-2}$	97,0±2,4	0
Галламин 	$1 \cdot 10^{-4}$	37,2±2,4	0
	$2,5 \cdot 10^{-3}$	—	0

сорбция ДФА в анионном участке активного центра препятствует подходу и гидролизу заряженных и незаряженных субстратов за счет стерического блокирования всего активного центра, алкилирование анионных участков в активном центре и вне его сопровождается конформационными изменениями в области каталитического центра, которые оказываются исключительно благоприятными для подхода и гидролиза незаряженного субстрата ИФА.

Исследование термостабильности холинэстераз, обработанных ДФА и ДНФА, может быть важным для выявления тонких изменений структуры ферментов, происходящих как при специфическом алкилировании анионных участков каталитического и регуляторного центров, так и при возможном неспецифическом алкилировании других функциональных групп белка и не идентифицируемых при исследовании свойств каталитического центра. Поэтому исследовали термостабильность полностью и частично модифицированной ацетилхолинэстеразы, а также частично ингибированных ионами ДФА и ДНФА бутирил- и пропионилхолинэстераз. Было интересно выяснить, не изменяется ли после алкилирования термостабильность той части исследованных холинэстераз, которая сохраняет активность по отношению к АХ.

Как видно из табл. 2, ярко выраженное изменение термостабильности наблюдается только для ацетилхолинэстеразы и только когда фермент под действием ДФА практически полностью теряет каталитическую активность по отношению к АХ и в качестве субстрата используется ИФА. По-видимому, это является следствием конформационных изменений, происходящих при модификации фермента. Вероятно, при модификации молекула ацетилхолинэстеразы приобретает более устойчивую конформацию, что обеспечивает ферменту большую стабильность при нагревании. Для частично ингибированных бутирил- и пропионилхолинэстеразы, наоборот, наблюдается некоторое понижение термостабильности. Таким образом, данные по термостабильности свидетельствуют, что наблюдаемая при алкилировании ДФА модификация каталитических свойств ацетилхолинэстеразы действительно сопровождается изменением конформации фермента.

Исследование влияния на модифицированную ацетилхолинэстеразу бисчетвертичных обратимых ингибиторов представляет особый интерес,

поскольку в настоящее время накапливается все больше данных, что бисчетвертичные ингибиторы взаимодействуют с ацетилхолинэстеразой по двум различным анионным участкам [6—9]. Из полученных нами данных (табл. 3) следует, что некоторые моночетвертичные, а также полиметиленибисчетвертичные обратимые ингибиторы (декаметоний, гексаметоний) не обладают ингибирующим действием по отношению к модифицированному ферменту, в то время как по отношению к исходной ацетилхолинэстеразе они являются сильными обратимыми ингибиторами. При замене в молекуле бисчетвертичных соединений гибкой полиметиленовой цепи жесткой структурой в виде трех фенильных колец (ИЭМ-840 и ИЭМ-858) ингибирующее действие по отношению к модифицированной ацетилхолинэстеразе сохраняется, хотя и становится гораздо более низким, чем по отношению к исходному ферменту. Избирательный обратимый ингибитор бутирилхолинэстеразы ПК-105 [10] и трехкатионный обратимый ингибитор галламин не оказывают никакого влияния на модифицированную ацетилхолинэстеразу. При наличии в молекуле ингибиторов объемных ароматических радикалов (панкуроний, галантамин, эзерин) их ингибирующее действие резко снижается по отношению к модифицированному ферменту, но не утрачивается совсем, сохраняясь на значительно более низком уровне по сравнению с действием на нативный фермент. По-видимому, взаимодействие с модифицированной ацетилхолинэстеразой этих катионных ингибиторов ограничивается лишь их гидрофобной сорбцией на активной поверхности фермента. Отсутствие ингибирующего действия таких соединений, как декаметоний и галламин, которые, как предполагают [6—9], действуют по двум анионным участкам активной поверхности фермента, подтверждает выводы из наших кинетических данных, что ионы ДФА алкилируют кроме анионного участка в активном центре также и периферические анионные участки вне каталитического центра.

Так как K_1 для обратимого конкурентного связывания ДФА ниже, чем для неконкурентного, очевидно, что ионы азиридиния действуют в первую очередь на анионный участок активного центра холинэстераз. Поэтому модифицированная ацетилхолинэстераза представляет значительный интерес для выяснения роли анионного центра в каталитической функции холинэстераз. Оценивая остаточную активность фермента по скорости гидролиза ИФА, исследовали взаимодействие модифицированного и нативного фермента с катионным фосфорорганическим ингибитором Гд-42 ($\text{CH}_3(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})\text{P}(\text{O})\text{SC}_2\text{H}_4\text{S}^+(\text{CH}_3)\text{C}_2\text{H}_5$) и его незаряженным аналогом Гд-7 ($\text{CH}_3(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})\text{P}(\text{O})\text{SC}_2\text{H}_4\text{SC}_2\text{H}_5$). Для выяснения изменений в пространственной организации активного центра при модификации ацетилхолинэстеразы было исследовано ингибирование ферментативного гидролиза ИФА стереоизомерами этих ингибиторов* — Гд-42 и Гд-7, имеющими асимметрический центральный атом фосфора.

Поскольку для нативного фермента константы k_{II} и величины γ_a ($\gamma_a = k_{II}(-)\text{-изомера}/k_{II}(+)\text{-изомера}$), полученные при исследовании ингибирующего действия стереоизомеров фосфорорганических ингибиторов на гидролиз двух субстратов — АХ и ИФА, практически совпадают, то можно полагать, что ферментативный гидролиз обоих этих субстратов осуществляется одними и теми же активными центрами фермента.

Результаты, приведенные в табл. 4, показывают, что величина k_{II} скорости взаимодействия незаряженного ингибитора Гд-7 с модифицированным ферментом только в 3,3 раза ниже по сравнению с нативным, а для катионного ингибитора Гд-42 k_{II} взаимодействия с модифицированным ферментом снижается в 1000 раз и становится одинаковой по абсолютной величине с k_{II} для его незаряженного аналога Гд-7. Следовательно, модифицированный фермент совершенно теряет чувствительность к заряженной группе в отщепляющейся части фосфорорганических ингибиторов.

* Стереоизомеры Гд-42 и Гд-7 получены в лаборатории проф. Н. Н. Годовикова (Институт элементоорганических соединений АН СССР).

Константы скорости взаимодействия нативной и модифицированной ацетилхолинэстеразы с фосфорорганическими ингибиторами: $\text{CH}_3(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})\text{P}(\text{O})\text{SR}$

Ингибиторы	R—	$k_{II}, \text{M}^{-1} \text{мин}^{-1}$		$k_{II}(\text{нат.})$
		нативный фермент	модифицированный фермент	$k_{II}(\text{мод.})$
Гд-42	$-(\text{CH}_2)_2\overset{\oplus}{\text{S}}(\text{CH}_3)\text{C}_2\text{H}_5$	$(1,8 \pm 0,2) \cdot 10^7$	$(1,6 \pm 0,14) \cdot 10^4$	1130
Гд-7	$-(\text{CH}_2)_2\text{SC}_2\text{H}_5$	$(4,9 \pm 0,1) \cdot 10^4$	$(1,5 \pm 0,12) \cdot 10^4$	3,3

Таблица 5

Константы скорости взаимодействия нативной и модифицированной ацетилхолинэстеразы со стереоизомерами: $\text{CH}_3(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})\text{P}(\text{O})\text{SR}$ (субстрат ИФА)

Сtereoизомеры	Нативный фермент		Модифицированный фермент	
	$k_{II}, \text{M}^{-1} \text{мин}^{-1}$	Γ_a	$k_{II}, \text{M}^{-1} \text{мин}^{-1}$	Γ_a
Гд-42 (-)	$(1,9 \pm 0,17) \cdot 10^7$	12,0	$(1,7 \cdot 0,15) \cdot 10^4$	1,2
Гд-42 (+)	$(1,6 \pm 0,15) \cdot 10^6$		$(1,4 \pm 0,2) \cdot 10^4$	
R = $(\text{CH}_2)_2\overset{\oplus}{\text{S}}(\text{CH}_3)\text{C}_2\text{H}_5$				
Гд-7 (\pm)	$(4,9 \pm 0,08) \cdot 10^4$	7,9	$(1,5 \pm 0,3) \cdot 10^4$	1,7
Гд-7 (-)	$(8,7 \pm 0,24) \cdot 10^4$		$(1,9 \pm 0,28) \cdot 10^4$	
Гд-7 (+)	$(1,1 \pm 0,3) \cdot 10^4$		$(1,1 \pm 0,33) \cdot 10^4$	
R = $(\text{CH}_2)_2\text{SC}_2\text{H}_5$				

Для обеих пар исследованных стереоизомеров (табл. 5) величины Γ_a для модифицированной ацетилхолинэстеразы существенно снижаются по сравнению с нативным ферментом. Интересно, что для исследованных стереоизомеров Гд-42 и Гд-7 величины Γ_a для модифицированной ацетилхолинэстеразы совпадают с соотношением этих стереоизомеров, характерным для бутирилхолинэстеразы.

Таким образом, модификация каталитических свойств ацетилхолинэстеразы, осуществляемая посредством алкилирования анионных групп на активной поверхности фермента, сопровождается также существенным снижением стереоспецифичности эстеразного центра. Значительно более высокая по сравнению с бутирилхолинэстеразой стереоспецифичность ацетилхолинэстеразы утрачивается при модификации ионами азиридина, и по стереоспецифичности модифицированный фермент приближается к бутирилхолинэстеразе. Наряду с активацией ферментативного гидролиза ИФА этот факт представляет интерес для обсуждения.

Сtereoизомеры высокоспецифичных фосфорорганических ингибиторов служат тонким инструментом для исследования пространственной организации активного центра. Изменения в стереоспецифичности модифицированной ацетилхолинэстеразы свидетельствуют о пространственных перестройках, происходящих при алкилировании анионного участка. Алкилирование анионных групп формально равнозначно нейтрализации отрицательного заряда анионного участка активного центра и, возможно, других анионных групп фермента, что изменяет суммарный отрицательный заряд молекулы и, по-видимому, его третичную структуру. Вероятно, при этом значительно изменяется взаимное расположение функциональных групп эстеразного центра, что и приводит к снижению его стереоспецифичности.

Таким образом, модифицированный фермент можно рассматривать как замороженную конформацию — модель того конформационного состоя-

ния, которое имеет место при начальной ионной сорбции катионных субстратов и ингибиторов. Результатом изменения конформации при алкилировании анионного центра ацетилхолинэстеразы является активация катализа по отношению к ИФА и снижение стереоспецифичности эстеразного центра. При ионной сорбции катионных субстратов фосфорорганических ингибиторов также происходит формальная нейтрализация отрицательного заряда анионного центра и, возможно, наблюдаются локальные изменения в структуре активного центра, подобные изменениям, происходящим при алкилировании анионного участка ионами азиридиния. Результатом нейтрализации заряда анионного центра и индуцируемых ионным взаимодействием конформационных изменений в активном центре может быть снижение стерических затруднений для вхождения кислотной части сорбированной молекулы в полость эстеразного центра и активация вследствие этого стадий ацилирования и деацилирования, непосредственно связанных с катализом. Следовательно, роль анионного центра на активной поверхности фермента не ограничивается его ориентирующей, якорной функцией, обеспечивающей повышение вероятности соударений кислотной части сорбированной молекулы с эстеразным участком, а является более сложной, определяющей пространственную организацию активного центра, и, в конечном счете, более высокую стереоспецифичность и субстратную специфичность ацетилхолинэстеразы по сравнению с бутирилхолинэстеразой.

Экспериментальная часть

В качестве ферментов использовали частично очищенные препараты ацетилхолинэстеразы (КФ 3.1.1.7) из эритроцитов крови человека, бутирилхолинэстеразы (КФ 3.1.1.8) из сыворотки крови лошади и пропионилхолинэстеразы (КФ 3.1.1.8) из мозговой ткани производства Пермского научно-исследовательского института вакцин и сывороток.

В качестве обратимых ингибиторов использовали коммерческие и специально синтезированные препараты: тетраметиламмония бромид, тетраэтиламмония иодид, галантамина гидрохлорид, эзерина салицилат, гексаметония метилсульфобензоат, декаметония бромид, панкурония бромид, бисчетвертичный диэфир фталевой кислоты — ПК-105 * иодид и бисчетвертичные соединения ИЭМ-840 и ИЭМ-858 ** метилсульфобензоаты.

Для получения модифицированной ацетилхолинэстеразы фермент инкубировали с $1 \cdot 10^{-3}$ М ДФА в 0,1 М растворе KCl и 0,0067 М фосфатном буфере (рН 7,5; 25°). После 4—5 ч инкубации фермент пропускали через колонку с сефадексом G-25 для удаления остатка ингибитора. Концентрацию фермента после гель-фильтрации контролировали путем измерения оптической плотности раствора фермента на спектрофотометре при 280 нм. Полученная таким способом модифицированная ацетилхолинэстераза практически не гидролизовала АХ (остаточная активность по АХ не превышала 4—5% от контрольной) и со скоростью в 1,5—2,0 раза большей, чем нативный фермент, гидролизовала незаряженный субстрат ИФА. Для исследования термостабильности получали частично модифицированную ацетилхолинэстеразу при инкубации фермента с $5 \cdot 10^{-5}$ М ДФА. Остаточная активность такого фермента при использовании в качестве субстрата АХ составляла 40—50% от контрольной. Для исследования термостабильности получали также бутирил- и пропионилхолинэстеразы, частично (на 50—60%) ингибированные ДФА и ДНФА.

Действие на модифицированную ацетилхолинэстеразу обратимых и необратимых ингибиторов оценивали по их влиянию на скорость ферментативного гидролиза хромогенного субстрата ИФА ($6 \cdot 10^{-4}$ М), которую

* Синтезирован И. Я. Квитко в Ленинградском технологическом институте им. Ленсовета.

** Синтезированы в лаборатории проф. Н. В. Хромова-Борисова (Институт экспериментальной медицины АМН СССР).

определяли методом дифференциального фотометрирования на приборе ФЭК-60 при 610 нм и 23—24° в среде 0,075 М КСl, 0,025 М фосфатного буфера (рН 8,0). Концентрации этанола в пробах не превышали 4%.

Взаимодействие модифицированной ацетилхолинэстеразы с необратимыми фосфорорганическими ингибиторами оценивали величиной бимолекулярной константы скорости взаимодействия с ферментом — k_{II} ($k_{II} = \frac{1}{t|I|} \lg \frac{v_0}{v_t}$, где v_0 — начальная скорость гидролиза ИФА под действием фермента и v_t — скорость гидролиза ИФА через время t инкубации фермента с ингибитором). Действие обратимых ингибиторов выражали в процентах торможения скорости гидролиза ИФА. Торможение активности фермента для каждой концентрации ингибитора, а также значения k_{II} рассчитывали из 4—5 отдельных определений. Статистическую обработку данных производили по Мюллеру [11].

При исследовании термостабильности тепловую инактивацию ферментов проводили при 52° (ацетил- и пропионил-) и 58° (бутирилхолинэстераза) в среде 0,1 М КСl. Изменение активности холинэстераз при тепловой инактивации определяли по скорости гидролиза двух субстратов: АХ и ИФА. Термостабильность оценивали величиной τ (мин) — временем достижения 50% тепловой инактивации фермента. Ошибка каждого определения τ не превышала 8—10%.

ЛИТЕРАТУРА

1. Волкова Р. И., Кочетова Л. М. (1977) Биоорганическая химия, 3, 1539—1552.
2. Purdie J. E., McIvor R. A. (1966) Biochim. et biophys. acta, 128, 590—594.
3. Purdie J. E. (1969) Biochim. et biophys. acta, 185, 122—133.
4. Belleau B., DiTullio V. (1971) Can. J. Biochem., 49, 1131—1133.
5. O'Brien R. D. (1969) Biochem. J., 113, 713—719.
6. Changeux J.-P. (1966) Mol. Pharmacol., 2, 369—392.
7. Wee V. T., Sinka B. K., Taylor P. W., Chignell C. F. (1976) Mol. Pharmacol., 12, 667—677.
8. Волкова Р. И. (1968) Биохимия, 33, 604—611.
9. Roufogalis B. D., Tomas J. (1972) Mol. Pharmacol., 4, 181—186.
10. Волкова Р. И., Дмитриева Е. Н. (1976) Биохимия, 41, 443—451.
11. Müller K. H. (1960) Z. Landwirtsch. Versuchs u. Untersuchungswesen, 6, 195—198.

Поступила в редакцию
1.VIII.1977
После переработки
15.XI.1977

THE PROPERTIES OF HUMAN ERYTHROCYTE ACETYLCHOLINESTERASE MODIFIED BY N,N-DIMETHYL-2-PHENYLAZIRIDIUM IONS

VOLKOVA R. I., KOCHETOVA L. M.

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

Acetylcholinesterase (AChE) was incubated 4 hours with N,N-dimethyl-2-phenylaziridinium ($1 \cdot 10^{-3}$ M), which alkylates the anionic sites, and the resulting modified enzyme was studied in respect to its thermostability and catalytic properties. Modified AChE fails to hydrolyze acetylcholine, but cleaves the non-charged substrate, indophenylacetate, at a higher rate that does the native enzyme. Monoquarternary and some polymethylenebisquarternary inhibitors exert to effect on modified AChE, which is also insensitive to the nature of cationic group in the leaving portion of the organophosphorus inhibitors. Cationic compounds having bulky aromatic groups (galantamin, pancuronium and some other) are much less effective inhibitors of the modified than native forms of AChE. When studying inhibitory activity of enantiomeric organophosphorus compounds $\text{CH}_3(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})\text{P}(\text{O})\text{SR}$, a considerable loss in stereospecificity of esterase site was revealed in modified AChE. The stereospecificity of the latter is of the same order as that of butyrylcholinesterase. It is hypothetically suggested that modified AcCE might represent a conformationally restricted form corresponding to the initial stage of ionic binding of cationic substrates or inhibitors.