



УДК 577.153.02 : 547.495.1

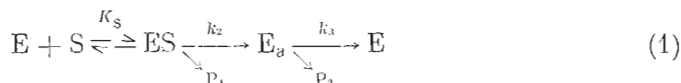
## ВЛИЯНИЕ НЕОРГАНИЧЕСКИХ СОЛЕЙ НА ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ БУТИРИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ С N-МЕТИЛКАРБАМОИЛХОЛИНОМ

*Игуменова Н. Д., Аавиксаар А. А., Богатков С. В.*

*Институт кибернетики Академии наук ЭССР, Таллин;  
Московский институт тонкой химической технологии  
им. М. В. Ломоносова*

Изучена кинетика реакции холинэстеразы сыворотки крови лошади (КФ 3.1.1.8) с N-метилкарбамоилхолином при 25° и pH 7,4 в присутствии различных нейтральных солей. Установлено, что влияние KCl, NaCl, CsCl, KBr, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и CaCl<sub>2</sub> сводится к увеличению константы диссоциации фермент-карбаматного комплекса, в то время как мономолекулярные константы скорости карбамоилирования и декарбамоилирования активного центра не меняются в интервале концентрации солей от 0,05 до 3,0 M. Обнаружено ранее неизвестное превращение карбамоилхолинэстеразы, ведущее к ее неполной реактивации в разбавленных растворах. Показано, что скорость этого мономолекулярного превращения зависит от концентрации и природы соли. Для объяснения наблюдаемого влияния на константу нековалентного связывания  $K_q$  предложена интерпретация экспериментальных данных, которая учитывает электростатическое взаимодействие катионного заряда в уходящей группе карбамоилхолина с анионным центром на активной поверхности фермента и разницу коэффициентов высаливания фермент-карбаматного комплекса и исходных реагентов.

В литературе [1—4] отмечено существенное влияние неорганических солей на кинетические параметры  $V$  и  $K_m$  для гидролиза субстратов под действием бутирилхолинэстеразы (КФ 3.1.1.8). Сложное содержание определяемых в эксперименте кажущихся констант в случае ее типичных субстратов, однако, не позволяло поставить задачу выяснения механизма этого влияния, так как неизвестно, на какой стадии ферментативного процесса (1)



проявляется эффект соли.

В случае реакции бутирилхолинэстеразы с карбатами (Q), где  $k_3 \ll \ll k_2$ , задача определения «элементарных» кинетических параметров значительно упрощается, что позволяет исследовать влияние эффекторов отдельно на константу нековалентного связывания ( $K_q$ ), на константу скорости карбамоилирования ( $k_2$ ) и на константу скорости декарбамоилирования ( $k_3$ ). Исходя из этого, в настоящей работе для изучения влияния неорганических солей на взаимодействие фермента с катионными субстратами была выбрана реакция с N-метилкарбамоилхолином. Для сравнения приводятся также данные по реакции с его незаряженным структурным аналогом, N-метилкарбаматом 3,3-диметилбутанола-1.

Влияние солей на взаимодействие бутирилхолинэстеразы с  
N-метилкарбамоилхолином \*  
25°, pH 7,4

$c, M$	$K_d \cdot 10^3, M$	$k_2, \text{мин}^{-1}$	$k_3^{\text{набл}} \cdot 10^3, \text{мин}^{-1}$	$\frac{A_\infty}{A_\infty^{\text{расч}}}$	$k_3 \cdot 10^3, \text{мин}^{-1}$
KCl					
0,001	0,089	0,287	—	—	—
0,004	0,320	0,38	—	—	—
0,01	0,590	0,48	—	—	—
0,025	0,915	0,52	—	—	—
0,05	1,25	0,57	8,20	0,50	4,10
0,09	2,48	0,58	—	—	—
0,15	2,94	0,72	6,34	0,64	4,06
					4,05 **
0,30	3,26	0,73	—	—	—
0,50	—	—	—	—	4,09 **
0,64	5,50	0,73	5,20	0,71	3,69
1,00	6,00	0,67	5,00	0,81	4,05
					3,74 **
1,50	9,52	0,61	4,06	0,93	3,78
					3,60 **
2,00	13,0	0,63	3,70	0,98	3,63
2,50	16,5	0,48	—	—	—
2,75	20,4	0,50	—	—	—
3,00	22,0	0,47	—	—	—
NaCl					
0,01	0,589	0,39	—	—	—
0,05	1,67	0,54	7,45	0,52	3,87
0,10	—	—	6,75	0,57	3,85
0,15	2,63	0,57	6,10	0,63	3,84
0,30	—	—	6,17	0,68	4,20
0,50	5,72	0,59	—	—	—
0,64	—	—	5,60	0,76	4,26
1,00	8,50	0,50	5,17	0,82	4,24
1,50	—	—	4,43	0,87	3,85
2,00	13,7	0,57	3,98	0,98	3,90
CsCl					
0,02	0,690	0,39	—	—	—
0,25	4,55	0,44	—	—	—
1,05	8,00	0,22	—	—	—
KBr					
0,02	0,910	0,49	—	—	—
0,05	—	—	7,66	0,48	3,68
0,10	—	—	7,68	0,50	3,84
0,15	—	—	7,47	0,52	3,88
0,30	—	—	6,82	0,59	4,02
0,36	4,55	0,67	—	—	—
0,64	—	—	6,52	0,62	4,04
1,0	—	—	5,97	0,63	3,76
1,4	9,30	0,37	—	—	—
1,5	—	—	6,17	0,63	3,89
2,0	—	—	5,56	0,65	3,61
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>					
0,01	1,00	0,47	—	—	—
0,05	2,75	0,63	—	—	—
0,08	—	—	6,32	0,56	3,54
0,15	4,55	0,80	—	—	—
0,30	5,53	0,81	6,36	0,60	3,82

$c, M$	$K_q \cdot 10^3, M$	$k_2, \text{мин}^{-1}$	$k_3^{\text{набл}} \cdot 10^3, \text{мин}^{-1}$	$\frac{A_\infty}{A_\infty^{\text{расч}}}$	$k_3 \cdot 10^3, \text{мин}^{-1}$
0,50	—	—	5,56	0,62	3,45
0,60	6,25	0,83	5,43	0,67	3,64
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>					
0,06	3,85	0,55	—	—	—
0,80	7,00	0,49	—	—	—
1,00	7,90	0,59	—	—	—
CaCl <sub>2</sub>					
0,01	1,43	0,71	—	—	—
0,05	2,42	0,71	—	—	—
0,10	3,92	0,99	—	—	—
0,25	6,67	0,70	—	—	—
0,40	11,6	0,54	—	—	—

\* Кинетические константы  $K_q$ ,  $k_2$  и  $k_3$  (см. текст) определены со средними относительными погрешностями 12, 8 и 5% соответственно; определение  $A_\infty$  — см. уравнение (3).

\*\* Спонтанная реактивация при удалении избытка карбамата из реакционной смеси карбоамилирования гель-фильтрацией через сефадекс G-25.

Данные по влиянию солей на взаимодействие бутирилхолинэстеразы с метилкарбамоилхолином приведены в табл. 1. Из таблицы видно, что влияние неорганических солей сводится к увеличению константы диссоциации комплекса EQ при увеличении концентрации соли, так как мономолекулярная константа скорости карбоамилирования ( $k_2$ ) и константа скорости декарбоамилирования ( $k_3$ ) не меняются в диапазоне изменения концентраций солей соответственно от 0,05 до 3,0 и 2,0 М. Интерпретация экспериментальных результатов по кинетике декарбоамилирования при этом требует специального рассмотрения.

### Реакция декарбоамилирования

Опыты показали, что в 0,15 М растворе KCl при pH 7,4 в результате спонтанной реактивации карбоамилфермента по схеме



после 850-кратного разбавления карбоамилирующей смеси восстанавливается лишь 64% от ожидаемой ферментативной активности. Кинетические кривые реактивации при этом строго соответствуют реакции первого порядка, согласно уравнению

$$\lg(A_\infty - A_t) = \lg A_\infty - (k_3^{\text{набл}}/2,303)t, \quad (3)$$

где  $A_t$  — активность фермента, определяемая по скорости гидролиза субстрата ферментом, реактивировавшимся к моменту времени  $t$ , и  $A_\infty$  — активность при экспериментально бесконечном времени (больше 10 периодов полупревращения) реактивации карбоамилфермента в данных условиях.

При спонтанной реактивации карбоамилхолинэстеразы в условиях незначительного разбавления смеси карбоамилирования (при удалении избытка карбамата гель-фильтрацией через сефадекс G-25) экспериментальные значения  $A_\infty$  совпадают с ожидаемой величиной, т. е. происходит 100%-ная реактивация карбоамилфермента.

Эти данные указывают на то, что в разбавленных растворах карбоамилхолинэстеразы параллельно с декарбоамилированием происходит ранее не

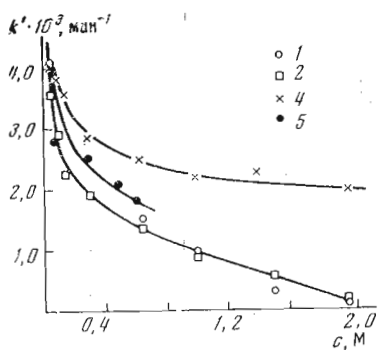


Рис. 1

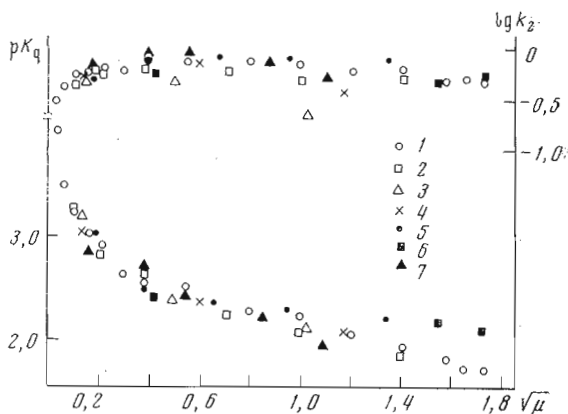
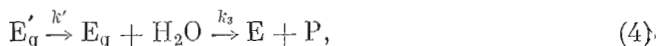


Рис. 2

Рис. 1. Зависимость константы скорости необратимой инактивации N-метилкарбамоилхолинэстеразы,  $k'$ , от концентрации соли при спонтанной реактивации  $E_q$ . Константа рассчитана по формулам (3), (5) и (6), согласно схеме (4). 1 — KCl; 2 — NaCl; 4 — KBr; 5 —  $K_2SO_4$

Рис. 2. Зависимость  $pK_q$  и  $lgk_2$  от квадратного корня ионной силы раствора,  $\sqrt{\mu}$ , для взаимодействия N-метилкарбамоилхолина с бутирилхолинэстеразой. Предполагаемая схема реакции — (15). 1 — KCl; 2 — NaCl; 3 — CsCl; 4 — KBr; 5 —  $K_2SO_4$ ; 6 —  $Na_2SO_4$ ; 7 — CaCl<sub>2</sub>

известный мономолекулярный процесс, ведущий к необратимой \* потере активности фермента. Превращение карбамоилхолинэстеразы в таком случае можно описать формальной схемой



где  $E_q'$  обозначает форму фермента, которая не реактивируется в данных условиях.

Для схемы (4) можно написать [5]:

$$k_3^{\text{набл}} = k_3 + k', \quad (5)$$

$$k_3 = k_3^{\text{набл}} \frac{[E]_{l=\infty}}{[E]_{l=\infty} + [E_q]_{l=\infty}} = k_3^{\text{набл}} \frac{[E]_{l=\infty}}{[E_q]_0} = k_3^{\text{набл}} \frac{A_{\infty}}{A_{\infty}^{\text{расч}}}. \quad (6)$$

Результаты обработки кинетических данных согласно уравнениям (3), (5) и (6) приведены в табл. 1. Из нее видно, что влияние солей на  $k_3^{\text{набл}}$  определяется только изменением  $k'$ .

Зависимость  $k'$  от концентрации солей показана на рис. 1. Из рисунка видно, что при увеличении концентраций электролитов  $k'$  уменьшается; в 2,0 M растворах KCl и NaCl она равна нулю и степень реактивации фермента достигает 100%. Эффективность влияния солей на  $k'$  увеличивается в ряду  $KBr < K_2SO_4 < KCl, NaCl$ , что указывает на определенную роль природы аниона в «стабилизации» карбамоилхолинэстеразы солями. Скорость предполагаемой реакции инактивации, по-видимому, зависит от общей концентрации белка в растворе, так как при удалении избытка карбамата из карбамоилирующей смеси гель-фильтрацией через сефадекс G-25, т. е. в условиях несущественного разбавления реакционной смеси, константа реактивации,  $k_3^{\text{набл}}$ , совпадает с  $k_3$ , рассчитанной по уравнению (6) в случае разбавленных растворов  $E_q$ . Длительная выдержка (до 48 ч) смеси карбамоилфермента с избытком карбамата перед разбавлением также

\* Необратимой в том отношении, что карбамоилфермент превращается в форму, которая в данных условиях не подвергается спонтанной реактивации.

Влияние KCl на карбоамилирование бутирилхолинэстеразы N-метилкарбаматом  
3,3-диметилбутанола-1  
25°, pH 7,4 \*

[KCl], М	$K_q \cdot 10^3$ , М	$k_2 \cdot 10^2$ , мин <sup>-1</sup>	[KCl], М	$K_q \cdot 10^3$ , М	$k_2 \cdot 10^2$ , мин <sup>-1</sup>
0 **	1,52	2,59	0,30	1,64	2,53
0,05	1,72	2,60	0,64	1,80	2,50
0,15	1,85	2,59	1,00	1,58	2,54

\* Кинетические константы  $K_q$  и  $k_2$  определены со средними относительными погрешностями 11 и 5% соответственно.

\*\* 0,002 М фосфатный буфер.

не приводит ни к уменьшению константы скорости декарбоамилирования, ни к изменению степени реактивации. Активность реактивированного фермента в реакции с бутирилхолином не отличается от активности исходного препарата.

Обнаруженная нами неполная реактивация карбоамилхолинэстеразы в разбавленных растворах (см. также [6]) объясняет отмеченное в работе [7] несоответствие кинетики декарбоамилирования формуле (3), так как в этой работе вместо экспериментальных значений  $A_\infty$  использовали величину, рассчитанную исходя из  $[E_q]_0$ .

#### Реакция карбоамилирования

На рис. 2 данные из табл. 1 по карбоамилированию бутирилхолинэстеразы под действием N-метилкарбоамилхолина представлены в координатах уравнения Бренстеда [8]:  $\lg k_2$  и  $pK_q$  как функции  $\sqrt{\mu}$ . Из рисунка видно, что до значений  $\mu = 1$  влияние всех солей, в том числе 1 : 1-, 1 : 2- и 2 : 1-электролитов, на  $pK_q$  описывается общей кривой. Можно думать, что эта зависимость определяется влиянием ионной силы раствора на эффективность взаимодействия катионной группировки в уходящей части карбоамилхолина с анионным центром на активной поверхности фермента. С таким предположением согласуются и данные табл. 2, которые показывают, что в реакции карбоамилирования бутирилхолинэстеразы под действием незаряженного структурного аналога N-метилкарбоамилхолина KCl в концентрациях до 1,0 М не влияет на кинетические параметры процесса.

Недавно в ряде работ [9—11] получил новое развитие электростатический подход к истолкованию кривых солевого эффекта в межмолекулярных реакциях. Согласно этим представлениям, свободную энергию диссоциации комплекса бутирилхолинэстеразы с катионным реагентом можно представить следующей суммой:

$$\Delta F = \Delta F_{\text{неэл}} + \Delta F_{\text{эл}}(\mu) + \Delta F_c, \quad (7)$$

где  $\Delta F_{\text{неэл}}$  обозначает независимую от концентрации и природы соли часть свободной энергии диссоциации,  $\Delta F_{\text{эл}}(\mu)$  — вклад электростатического взаимодействия зарядов  $z_e$  и  $z_q$  в EQ-комплексе,  $\Delta F_c$  — эффект высаливания, который описывается соотношением

$$\Delta F_c = -2,303 RT \Delta \chi c, \quad (8)$$

где  $\Delta \chi$  определяется разницей коэффициентов высаливания EQ-комплекса и исходных реагентов,  $\Delta \chi = \chi_{\text{еq}} - \chi_e - \chi_q$ ;  $c$  — концентрация соли.

Слагаемое  $\Delta F_{\text{эл}}$  имеет максимальное значение при нулевой ионной силе и равно нулю при  $\mu \geq 1$  [9—11]. Последнее обстоятельство дает возмож-

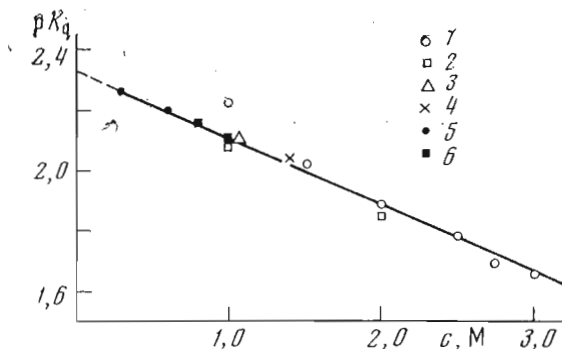


Рис. 3. Зависимость  $pK_q$  от концентрации соли при ионной силе раствора от 1 до 3 для взаимодействия *N*-метилкарбамоилхолина с бутирилхолинэстеразой. Обозначение солей как на рис. 2

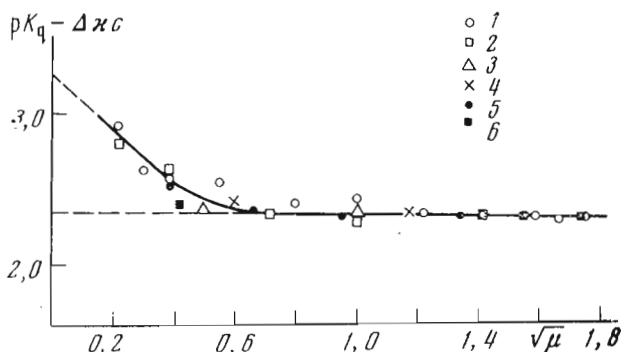


Рис. 4. Зависимость  $pK_q - \Delta xс$  от квадратного корня ионной силы раствора,  $\sqrt{\mu}$ , для взаимодействия *N*-метилкарбамоилхолина с бутирилхолинэстеразой. Обозначение солей как на рис. 2

ность экспериментального разделения вкладов  $\Delta F_{эл}(\mu)$  и  $\Delta F_c$  в наблюдаемом солевом эффекте, так как при  $\mu \geq 1$

$$pK_{q, \mu \geq 1} = pK_{q, \text{несэл}} - \Delta xс \quad (9)$$

и при  $\mu = 0$

$$pK_{q, \mu=0} = pK_{q, \text{несэл}} + \frac{\Delta F_{эл}(\mu=0)}{2,303RT}, \quad (10)$$

откуда

$$\frac{\Delta F_{эл}(\mu=0)}{2,303RT} = pK_{q, \mu=0} - pK_{q, \mu \geq 1} - \Delta xс = pK_{q, \mu=0} - pK_{q, \text{несэл}}. \quad (11)$$

Получаемую из уравнения (11)  $\Delta F_{эл}(\mu=0)$  можно сопоставить с теоретической величиной [10]

$$\Delta F_{эл}(\mu=0) = \frac{Ne^2 z_e z_q}{Dr}, \quad (12)$$

где  $N$  — число Авогадро,  $e$  — заряд электрона,  $z_e$  и  $z_q$  — эффективные заряды анионного центра фермента и карбамата,  $r$  — расстояние между зарядами  $z_e$  и  $z_q$  в ЕQ-комплексе,  $D$  — диэлектрическая проницаемость.

Обработка экспериментальных данных согласно уравнению (9) показана на рис. 3. Из рисунка видно, что  $pK_{q, \mu \geq 1}$  в присутствии  $KCl$ ,  $NaCl$ ,  $CsCl$ ,  $KBr$ ,  $K_2SO_4$  и  $Na_2SO_4$  ложатся на общую прямую с наклоном  $\Delta xс = -0,23 \pm 0,01$  и отрезком на оси ординат  $pK_{q, \text{несэл}} = 2,35 \pm 0,02$ . Из этой зависимости выпадают  $pK_q$  в присутствии  $CaCl_2$ , по всей вероятности, из-за специфического действия  $Ca^{2+}$  на ферментный белок.

В свете литературных данных по эффектам высаливания щелочного [9], а также ацетилхолинэстеразного [12] гидролиза ацетатов независимость  $\Delta k$  от природы соли для диссоциации EQ-комплекса в реакции бутирилхолинэстеразы с N-метилкарбамоилхолином и значение  $\Delta k = 0$  для стадии карбамоилирования являются весьма неожиданными экспериментальными фактами. Как было показано нами в предыдущей работе [13], в реакции бутирилхолинэстеразы с N-метилкарбатами значительную роль играет гидрофобное взаимодействие между уходящей группой карбата и активным центром фермента: чувствительность бимолекулярной константы карбамоилирования активного центра к изменению гидрофобности заместителя в уходящей группе карбатов выражается значением  $\phi = 1,9 \pm \pm 0,1$ . По аналогии с ацетилхолинэстеразой [14] это указывает на проявление гидрофобности заместителя как на стадии нековалентного связывания, так и на стадии карбамоилирования. Как можно было ожидать, в случае реакции ацетилхолинэстеразы с ацетатами зависимость от природы соли эффекты высаливания проявлялись в обеих стадиях [12]. В этом отношении результаты настоящей работы указывают на новый аспект отмеченных в литературе ранее (см., например, [15]) существенных различий между конформационными свойствами анионных участков в активных центрах ацетил- и бутирилхолинэстераз.

Отсутствие кинетического солевого эффекта на стадии мономолекулярного карбамоилирования бутирилхолинэстеразы под действием N-метилкарбамоилхолина, по-видимому, связано с нейтрализацией в EQ-комплексе катионного заряда субстрата отрицательным зарядом анионного центра.

На рис. 4 показана зависимость «очищенной» от эффектов высаливания  $pK_q$  от  $\sqrt{\mu}$ . В этой зависимости опущены  $pK_q$  при  $\mu < 0,05$ , при которых наблюдается искривление зависимости  $\lg k_2$  от  $\sqrt{\mu}$  (см. рис. 2), связанное, возможно, с появлением конформационной формы фермента\*, обладающей меньшей каталитической активностью в реакции с карбатами.

Не пытаясь оценить, какие изменения в связывании субстратов могли бы иметь место для этой формы фермента, отметим, что с практической точки зрения исключение из рассмотрения значений  $pK_q$  при  $\mu < 0,05$  означает, что сделанные в работе выводы из анализа кривой солевого эффекта относятся к конформации бутирилхолинэстеразы, стабильной при  $\mu > 0,05$ .

Зависимость  $pK_q - \Delta k_s$  от  $\sqrt{\mu}$  на рис. 4 можно считать истинной кривой солевого эффекта, которая описывает влияние ионной силы на электростатическое взаимодействие между катионной группой субстрата и анионной группой в активном центре бутирилхолинэстеразы. По форме эта зависимость совпадает с кривыми кинетического солевого эффекта в меж-ионных реакциях [9, 11]. При обработке данных по  $pK_q$  при невысоких ионных силах ( $\sqrt{\mu} \leq 0,4$ ) по эмпирическому уравнению

$$pK_q - \Delta k_s = pK_{q, \mu=0} - \alpha \sqrt{\mu} \quad (13)$$

получают  $pK_{q, \mu=0} = 3,23 \pm 0,11$  и наклон,  $\alpha = -1,76 \pm 0,33$ , который, как и следовало ожидать на основании результатов предыдущих работ [9—11], не согласуется по величине с предельным наклоном  $-1,02$  в уравнении Бренстеда — Дебая для одновалентных ионов с противоположными знаками. Для  $\Delta F_{эл} (\mu = 0)$  из уравнения (11) получено значение  $-1,23$  ккал/моль.

Таким образом, использование представлений об электростатическом эффекте и эффекте высаливания, выражаемых уравнениями (7)—(11), позволяет последовательно и непротиворечиво описать наблюдаемые экспериментальные данные, хотя непреодолимые в настоящее время труд-

\* Наличие такой формы фермента при низких ионных силах раствора было спектрально доказано в случае химотрипсина [16].

ности оценке эффективной диэлектрической проницаемости при взаимодействии катионной группы с анионным центром фермента мешают использовать уравнение (12) для расчета  $r$  и тем самым для количественной проверки предположенного механизма влияния солей на взаимодействие бутирилхолинэстеразы с карбамоилхолином. Необходимо, однако, отметить, что независимая от концентрации солей бимолекулярная константа карбамоилирования бутирилхолинэстеразы N-метилкарбамоилхолином,  $k_{II} = 1,41 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ мин}^{-1}$ , полученная делением  $k_2$ , характерной для стабильной при  $\mu > 0,05$  форме фермента, на  $K_{q, \text{несл}}$ , ложится на корреляционную прямую, описывающую влияние уходящей группы N-метилкарбаматов,  $\text{CH}_3\text{NHC(O)OX}$ , на скорость карбамоилирования активного центра бутирилхолинэстеразы:

$$\lg k_{II} - (4,43 \pm 0,37) \sigma_x^* = (-4,59 \pm 0,33) + (1,85 \pm 0,14) \pi_x$$

при значении  $\pi$  для  $\text{CH}_2\text{CH}_2\overset{+}{\text{N}}(\text{CH}_3)_3$ , равном 2,5 [13]. Это согласуется с предположением, что при ионных силах выше единицы  $\Delta F_{\text{эл}} (\mu)$  в свободной энергии диссоциации комплекса бутирилхолинэстеразы с карбамоилхолином равна нулю.

С другой стороны, в настоящее время мы не можем полностью отвергнуть возможность альтернативного объяснения наблюдаемых эффектов, а именно предположения о конкурентном ингибировании реакции карбамоилирования катионами солей. С этим предположением формально согласуется пересечение прямых в координатах  $1/k_I$  от  $1/[Q]$  на оси ординат для разных электролитов (см. рис. 7б). На рис. 5 показана зависимость  $K_q$  от  $[\text{Me}^{z+}]$ , согласно уравнению

$$K_q = K_q^0 + \frac{K_i^0}{K_i} [\text{Me}^{z+}], \quad (14)$$

где  $K_i$  — константа ингибирования и  $\text{Me}^{z+}$  — катион металла. Из рисунка видно, однако, что если конкурентное ингибирование и является одним из компонентов влияния солей на  $K_q$ , то оно сильно маскируется взаимодействиями других типов.

Как известно, на наблюдаемый солевой эффект может оказать влияние смещение  $pK_a$  ионизирующихся функциональных групп активного центра фермента при изменении ионной силы раствора — вторичный солевой эффект [8]. Из данных, приведенных на рис. 6, тем не менее вытекает, что использованное в настоящей работе значение  $pH$  7,4 было достаточно высоко, чтобы пренебречь этими эффектами.

С другой стороны, на рис. 6 отчетливо видна интересная особенность  $pH$ -зависимостей  $k_2$  и  $K_q$  в случае реакции бутирилхолинэстеразы с N-метилкарбамоилхолином. Она заключается в том, что во влиянии  $pH$  на  $K_q$  в 0,15 M растворе KCl проявляется  $pK_a \sim 7$ , а  $k_2$  не показывает никакой тенденции к уменьшению вплоть до  $pH$  6,5. Если связывать  $pH$ -зависимость с проявлением  $pK_a$  имидазола гистидина, как обычно делают в случае сериновых гидролаз, а  $pH$ -зависимость  $K_q$  в данном случае — с проявлением  $pK_a$  анионного центра, то из этих данных вытекает, что функциональный имидазол в активном центре бутирилхолинэстеразы имеет  $pK_a$  ниже чем 6, в то время как карбоксильная группа анионного центра имеет  $pK_a$  около нейтральной. Хотя имеющиеся в настоящее время экспериментальные данные по  $pH$ -зависимостям констант карбамоилирования бутирилхолинэстеразы не позволяют сделать окончательный выбор между этим выводом и альтернативными объяснениями, обсуждаемыми в литературе в случае ацетилхолинэстеразы [17], отметим, что наличие в активном центре фермента имидазольной группы с  $pK_a \sim 3,8$  и карбоксильной группы с  $pK_a \sim 6,8$  было на основе данных ЯМР-спектроскопии продемонстрировано Ханкапиллером и др. [18] для  $\alpha$ -литической протеазы. Значения  $pK_a$  для имидазола в промежутке от 4,5 до 5,0 были найдены [19] в активных центрах химотрипсина и трипсина.



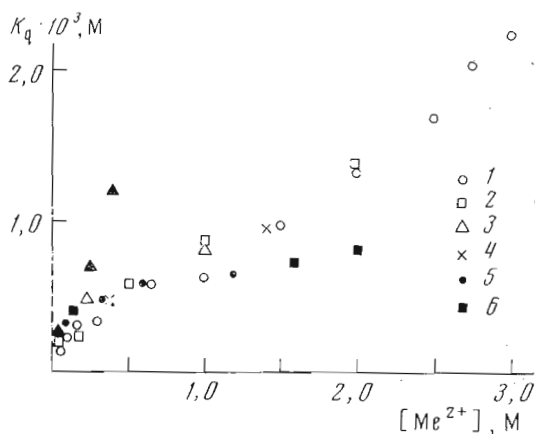


Рис. 5. Зависимость наблюдаемой константы диссоциации фермент-карбаматного комплекса,  $K_q$ , от молярной концентрации катиона, при взаимодействии N-метилкарбамоилхолина с бутирилхолинэстеразой. Обозначения солей как на рис. 2

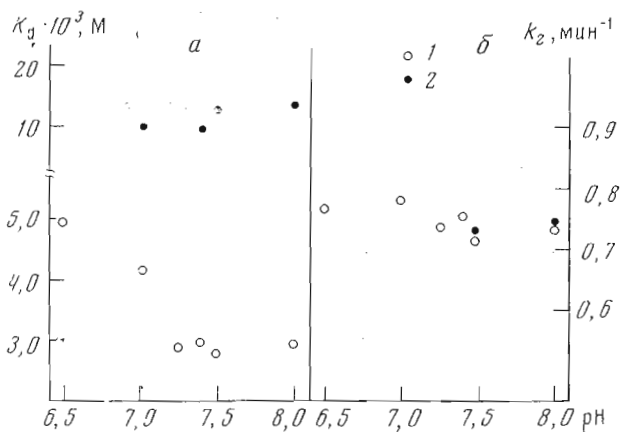
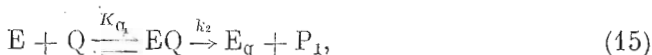


Рис. 6. Зависимости  $K_q$  (а) и  $k_2$  (б) от рН в реакции N-метилкарбамоилхолина с бутирилхолинэстеразой при 25°. 1 — 0,15 М КСl, 2 — 1,5 М КСl

### Экспериментальная часть

В работе использовали лиофильно высушенный препарат бутирилхолинэстеразы из сыворотки крови лошади, производства НИИ вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова МЗ РСФСР (Москва) с уд. акт. 6,7 Е/мг белка. В качестве субстратов использовали бутирилхолин подистый или ацетилхолин подистый фирмы Сметарол (Чехословакия). Синтез и свойства N-метилкарбамоилхолина подистого и N-метилкарбамата 3,3-диметилбутанола-1 описаны нами ранее [13]. КСl и NaCl — препараты марки ос. ч., KBr, CsCl,  $K_2SO_4$ ,  $Na_2SO_4$  и  $CaCl_2$  — марки х.ч.

Кинетику карбамоилирования бутирилхолинэстеразы при 25° и рН 7,4 измеряли в псевдомолекулярных условиях,  $[Q]_0 \gg [E]_0$ , по убыли активности фермента, согласно схеме



используя бутирилхолин или ацетилхолин в качестве субстрата. В случае N-метилкарбамоилхолина реакции проводили в термостатированной ячейке рН-стата в 15-мл порциях, которые отбирали из растворов бутирилхо-

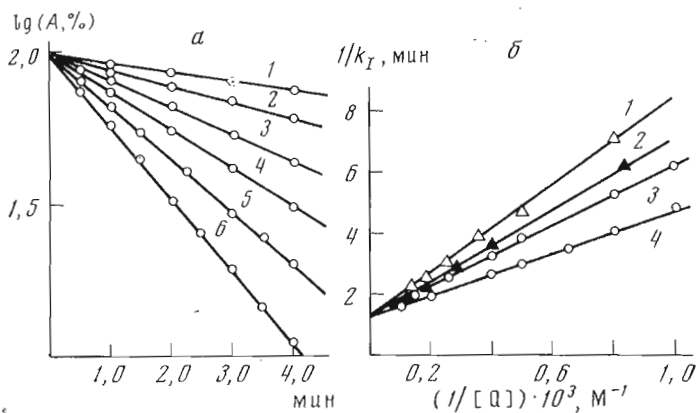


Рис. 7. Обработка экспериментальных данных по карбамоилрованию активного центра бутирилхолинэстеразы под действием N-метилкарбамоилхолина при 25° и pH 7,4. *a* — определение константы скорости первого порядка,  $k_1$ , согласно уравнению (16).  $[E]_0 = 0,015$  мг/мл, 0,15 М КСl. Концентрация карбамата, М: 1— $3,0 \cdot 10^{-4}$ ; 2— $5,5 \cdot 10^{-4}$ ; 3— $1,0 \cdot 10^{-3}$ ; 4— $2,5 \cdot 10^{-3}$ ; 5— $3,75 \cdot 10^{-3}$ ; 6— $8,0 \cdot 10^{-3}$ . *b* — зависимость  $1/k_1$  от  $1/[Q]$ .  $[E]_0 = 0,015$  мг/мл. 1—0,36 М КBr; 2—0,15 М  $K_2SO_4$ ; 3—0,30 М КСl; 4—0,15 М КСl

линэстеразы, содержащих определенные концентрации солей. Через разные для каждой порции промежутки времени (от 30 с до нескольких минут после прибавления 0,2 мл запасного раствора карбамата в ячейку) определяли остаточную активность фермента в ячейке, добавляя раствор субстрата в концентрации  $2 \cdot 10^{-2}$  М. Остаточную активность бутирилхолинэстеразы оценивали по начальной скорости ферментативного гидролиза субстрата при pH 7,4 титрованием образующейся кислоты 0,05 М раствором КОН.

Карбамоилрование бутирилхолинэстеразы незаряженным карбаматом проводили в 0,005 М фосфатном буфере, содержащем определенную концентрацию соли. В течение 50—60 мин из реакционной смеси отбирали аликвоты в ячейку pH-стата, содержащую 0,15 М раствор КСl (разбавление в 75 раз), и определяли в них остаточную активность фермента по ацетилхолину или бутирилхолину.

Наблюдаемые константы первого порядка,  $k_1$ , определяли из наклонов прямых в координатах  $\lg A_t$  от  $t$ , согласно уравнению

$$\lg A_t = \lg A_0 - (k_1/2,303) t, \quad (16)$$

где  $A_0$  — активность, определяемая по скорости ферментативного гидролиза субстрата сразу после добавления карбамата, и  $A_t$  — активность после реакции бутирилхолинэстеразы с карбаматом в течение времени  $t$  (см. рис. 7*a*). Степень превращения в реакции карбамоилрования составляла 10—90%, в зависимости от концентрации карбаматов и солей. Константы  $K_q$  и  $k_2$  находили из линейной трансформации уравнения Михаэлиса в координатах  $1/k_1$  и  $1/[Q]$  (см. рис. 7*b*).

Для определения  $k_3$  фермент ( $[E] = 13-60$  мг/мл) инкубировали в течение 2 ч с  $10^{-2}$  М раствором N-метилкарбамоилхолина в  $5 \cdot 10^{-3}$  М фосфатном буфере, содержащем определенные концентрации солей. За это время угнетение активности составляло 90—95%. Затем реакционную смесь разбавляли в 850 раз и определяли скорость спонтанной реактивации карбамоилфермента методом отбора проб, как описано выше.

Кинетические измерения активности бутирилхолинэстеразы проводили на pH-стате фирмы Radiometer (Дания, комплект TTT2/SBR3/ABU 12). Вычисление кинетических констант и статистическую обработку экспери-

ментальных данных по методу наименьших квадратов осуществляли на ЭВМ в вычислительных центрах МИТХТ им. М. В. Ломоносова и Института кибернетики АН ЭССР.

Авторы благодарны М. Ю. Пабериту за ценные замечания при обсуждении этой работы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Van Der Meer C. (1953) *Nature*, **171**, 78—79.
2. Hofstee V. H. J. (1960) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **128**, 299—306.
3. Фрунтова Т. А. (1967) *Биохимия*, **32**, 341—346.
4. Wang E. I. C. (1970) *Biochim. et biophys. acta*, **198**, 236—241.
5. Панченков Г. М., Лебедев В. П. (1974) *Химическая кинетика и катализ*, с. 34—35, «Химия», М.
6. Игумнова Н. Д., Богатков С. В., Аавиксаар А. А. (1976) Тезисы стендовых сообщений III Всесоюзного симпозиума «Структура и функции активных центров ферментов», с. 15, «Наука», М.
7. Игумнова Н. Д., Богатков С. В., Черкасова Е. М. (1975) *Биохимия*, **40**, 999—1003.
8. Уэбб Л. (1966) *Ингибиторы ферментов и метаболизма*, с. 758—768, «Мир», М.
9. Ярв Я. Л., Аавиксаар А. А., Годовиков Н. Н., Морозова Н. А. (1972) *Реакц. способ. орг. соед.*, **9**, 813—829.
10. Пальм В. А., Нуммерт В. М., Плюсс Т. О., Карельсон М. М., Коппель И. А. (1973) *Реакц. способ. орг. соед.*, **10**, 223—242.
11. Ярв Я., Кесватера Т., Аавиксаар А. (1976) *Уч. зап. Тартуск. гос. ун-та*, **384**, 104—117.
12. Кесватера Т. А., Пээнема Э. В., Ярв Я. Л. (1976) *Материалы пятой биохимической конференции прибалтийских республик и Белорусской ССР*, с. 29—30, Таллин.
13. Игумнова Н. Д., Аавиксаар А. А., Богатков С. В. (1977) *Биоорг. химия*, **3**, 1401—1406.
14. Järv J., Kesvatera T., Aaviksaar A. (1976) *Eur. J. Biochem.*, **67**, 315—322.
15. Яковлев В. А. (1965) *Кинетика ферментативного катализа*, с. 138—242, «Наука», М.
16. Dorrington K. J., Hofman T. (1973) *Can. J. Biochem.*, **51**, 1059—1065.
17. Rosenberry T. L. (1975) *Croatica chim. acta*, **47**, 235—250.
18. Huntpiller M. W., Smallcombe S. H., Whitaker D. R., Richards J. H. (1973) *Biochemistry*, **12**, 4732—4743.
19. Porubcan M. A., Ibanez J., Markby J. L. (1975) *Fed. Proc.*, **34**, 1475.

Поступила в редакцию  
19.XII.1977

#### EFFECT OF INORGANIC SALTS ON THE BUTYRYLCHOLINESTERASE REACTION WITH N-METHYLCARBAMYLCHOLINE

IGUMNOVA N. D., AAVIKSAAR A. A., BOGATKOV S. V.

*Institute of Cybernetics, Academy of Sciences of the Estonian SSR,  
Tallinn;  
M. V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technology, Moscow*

The effect of inorganic salts on the kinetics of the reaction of horse serum cholinesterase (EC 3.1.1.8) with N-methylcarbamylcholine at 25° and pH 7.4 has been investigated. KCl, NaCl, CsCl, KBr, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and CaCl<sub>2</sub> increased the enzyme-carbamate intermediate dissociation constant and had no effect on unimolecular carbamylation and decarbamylation rate constants in the range of salt concentrations from 0.05 to 3.0 M. A new carbamyl-enzyme inactivation reaction has been discovered, which leads to incomplete recovery of the modified enzyme in dilute solutions. The velocity of this process depends upon the nature and concentration of and added salt. The interpretation of experimental salt effect on  $K_i^*$ , the non-covalent binding constant, has been proposed, which takes into account electrostatic interaction between the cationic charge of carbamylcholine leaving group and an anionic center on cholinesterase active surface, as well as the difference between the salting out coefficients of enzyme-carbamate intermediate and initial reagents.