



УДК 577.153.02

**ЭФФЕКТЫ ОТЩЕПЛЯЕМОЙ ГРУППЫ СУБСТРАТОВ
В РЕАКЦИИ С БУТИРИЛХОЛИНЭСТЕРАЗОЙ***Ярв Я. Л., Лангель Ю. Л.**Тартуский государственный университет, ЭССР*

Изучена кинетика катализируемого бутирилхолинэстеразой гидролиза ацетатов CH_3COOX с углеводородными, ненонными электроотрицательными и катионными заместителями X в отщепляемой части субстратов, что позволило описать топографию активной поверхности фермента и специфичность его действия на стадиях нековалентного связывания и образования ацетилфермента. Показано, что в реакционной стадии наряду с индукционным и стерическим влияниями проявляется также гидрофобность заместителя. Для катионных субстратов рассчитаны вклады анионного центра и обсуждается возможный механизм его проявления в кинетике. Подтверждается представление о том, что основная роль анионного центра в определении специфичности действия холинэстераз заключается в компенсации «антигидрофобности» катионного заместителя, связанной с невыгодностью введения заряженной группы субстрата в гидрофобную область активного центра фермента. Проведенный систематический анализ позволил также определить константу скорости реакции дезацетилирования фермента.

Изучение физико-химических основ специфичности биокатализа приводит к необходимости количественной характеристики тех факторов и механизмов взаимодействий, которые обеспечивают «узнавание» реагента в активном центре фермента. Для практического решения этой проблемы применимы подходы, разработанные в рамках формальной теории реакционной способности органических соединений, и методы корреляционного анализа. При этом, наряду с проявляющимися в неферментативных реакциях эффектами строения, в случае ферментативных процессов необходимо также учесть межмолекулярные взаимодействия реагента с активной поверхностью фермента. Среди имеющихся представлений о факторах, определяющих эффективность связывания реагента в активном центре, немаловажное значение имеет взаимодействие ионных групп фермента и субстрата или ингибитора [1].

Объектами, для которых удобно исследовать закономерности проявления этого фактора специфичности, являются холинэстеразы, активная поверхность которых включает так называемый «анионный центр связывания» [2]. Количественная характеристика эффекта анионного центра в реакциях холинэстераз требует, однако, предварительного учета всех остальных факторов строения. Соответствующий систематический анализ специфичности ацетилхолинэстеразы (КФ 3.1.1.7) начат в наших предыдущих работах [3–6]. Количественные данные имеются также для реакции бутирилхолинэстеразы (КФ 3.1.1.8) с необратимыми ингибиторами — N-метилкарбаматами [7] и фосфорорганическими соединениями [8]. В дополнение к этому в настоящей работе изучено влияние строения отщепляемой части субстратов в реакции с бутирилхолинэстеразой.

Кинетические константы катализируемого бутирилхолинэстеразой гидролиза
 ацетатов CH_3COOH при 25° , pH 7,5, 0,15 М КСl, и постоянные π , σ^* и E_s заместителей
 В скобках приведены эффективные π -константы, использованные
 в корреляциях

№ п. п.	X	$k_{II} \cdot 10^{-2}$, М ⁻¹ ·с ⁻¹	$K_S(\text{нак}) \cdot 10^2$, М	$k_{\text{кат}} \cdot 10^{-2}$, с ⁻¹	π [11, 18, 31]	σ^* [29, 30]	$-E_s$ [10]
1	C_2H_5	0,794±0,028	15,8±2,3	0,148±0,022	1,0	0,07	0,36
2	C_3H_7	3,89±0,11	8,32±0,75	0,245±0,030	1,5	0	0,39
3	C_4H_9	19,0±0,55	2,88±0,15	0,660±0,042	2,0	0	0,40
4	C_5H_{11}	30,9±2,1	1,74±0,13	0,575±0,045	2,5 (2,0)	0	0,30
5	C_6H_{13}	25,1±2,2	1,00±0,11	0,223±0,023	3,0 (2,0)	0	0,40
6	C_7H_{15}	251±35	—	—	3,5 (2,0)	0	0,40
7	C_8H_{17}	398±60	—	—	4,0 (2,0)	0	0,40
8	$\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	7,08±0,46	5,01±0,51	0,331±0,041	1,8	0	0,35
9	$\text{C}_2\text{H}_5\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	79,4±3,5	1,26±0,11	0,891±0,071	2,3	0	0,43
10	$\text{C}_2\text{H}_5\text{C}(\text{CH}_3)_3$	851±39	0,251±0,035	2,51±0,40	2,98	0	0,40
11	$\text{C}(\text{CH}_3)_3$	—	—	—	1,98	≈ 0	1,74
12	$\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{C}_2\text{H}_5$	—	—	—	2,48	≈ 0	1,74
13	$\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	—	—	—	1,30	≈ 0	0,93
14	цикло- C_6H_{11}	4,75±0,17	1,62±0,21	0,074±0,009	2,51	≈ 0	0,98
15	$\text{CH}(\text{CH}_3)\text{C}_2\text{H}_5$	0,2	—	—	1,80	≈ 0	0,93
16	C_6H_5	1510±80	0,478±0,037	6,31±0,54	2,13	0,60	0,38
17	$\text{CH}_2\text{SC}_2\text{H}_5$	50,1±2,5	3,55±0,31	2,51±0,20	1,45	0,56	0,44
18	$\text{CH}_2\text{C}=\text{CH}$	8,91±0,30	20,9±2,4	1,66±0,19	0,94	0,55	≈ 0,6
19	$\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$	2,57±0,15	15,8±2,2	0,398±0,050	1,23	0,23	≈ 0,2
20	$\text{C}_2\text{H}_5\text{Cl}$	12,5±0,43	5,89±0,50	0,794±0,072	1,39	0,39	0,48
21	$\text{C}_2\text{H}_5\text{SC}_2\text{H}_5$	13,6±1,1	4,47±0,57	0,661±0,070	1,95 (1,45)	0,22	0,44
22	$\text{C}_3\text{H}_6\text{Cl}$	19,1±0,7	3,16±0,25	0,631±0,059	1,89	0,14	0,40
23	$\text{C}_3\text{H}_6\text{SC}_2\text{H}_5$	7,08±0,48	3,16±0,38	0,190±0,021	2,45 (1,45)	0,08	0,40
24	$\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$	64,6±2,1	0,251±0,030	0,160±0,022	2,26 (?)	0,25	0,38
25	$\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	15,8±0,65	—	—	-3,7	1,28	0,40 *
26	$\text{C}_2\text{H}_5\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	7410±120	0,105±0,009	6,91±0,41	-3,2	0,52	0,40 *
27	$\text{C}_3\text{H}_6\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	25,1±1,2	—	—	-2,7 (-4,2)	0,20	0,40 *
28	$\text{CH}_2\text{S}^+(\text{CH}_3)\text{C}_2\text{H}_5$	141±5,5	—	—	-3,85	1,80	0,40 *
29	$\text{C}_2\text{H}_5\text{S}^+(\text{CH}_3)\text{C}_2\text{H}_5$	467±16	—	—	-3,35 (-3,85)	0,70	0,40 *
30	$\text{C}_3\text{H}_6\text{S}^+(\text{CH}_3)\text{C}_2\text{H}_5$	63,1±3,0	—	—	-2,85 (-4,15)	0,30	0,40 *
31	$\text{C}_4\text{H}_8\text{S}^+(\text{CH}_3)\text{C}_2\text{H}_5$	20,0±1,5	—	—	-2,35 (2,0)	0,10	0,40 *

* Использовали предельные значения E_s для алифатических заместителей $-(\text{CH}_2)_n\text{X}$ при $n > 2$, так как соответствующие величины в работе [10] вычислены без электростатической корреляции исходных констант скорости.

При анализе кинетики этой реакции исходили из трехстадийной схемы:



где ES — нековалентный фермент-субстратный комплекс, EA — ацетилфермент, P_1 и P_2 — образующиеся в реакции гидролиза спирт и уксусная

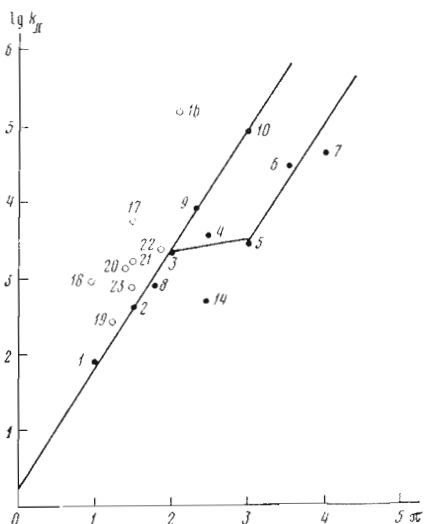


Рис. 1

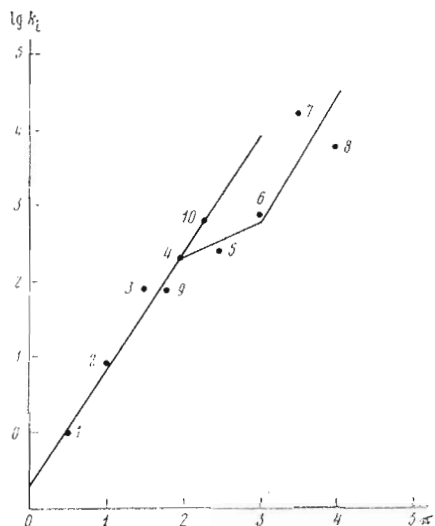


Рис. 2

Рис. 1. Зависимость бимолекулярной константы скорости катализируемого бутирилхолинэстеразой гидролиза неионных ацетатов CH_3COOX от гидрофобности заместителя X. Номера соединений соответствуют табл. 1

Рис. 2. Зависимость бутирилхолинэстеразной активности фосфорорганических ингибиторов $\text{RO}(\text{CH}_3)\text{P}(\text{O})\text{SC}_n\text{H}_{2n+1}$ от гидрофобности заместителя R по данным работы [13] (1-8 - *n*-алкильные радикалы $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}$ при $n=1-8$; 9 - $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)$; 10 - $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$)

кислота соответственно. Константы $k_{\text{кат}}$ и $K_{s(\text{как})}$ в уравнении скорости этой реакции

$$v = \frac{k_{\text{кат}}[\text{S}][\text{E}]}{K_{s(\text{как})} + [\text{S}]} \quad (4)$$

зависят от отношения k_2 и k_3 :

$$k_{\text{кат}} = \frac{k_2}{k_2/k_3 + 1}, \quad (5)$$

$$K_{s(\text{как})} = \frac{K_s}{k_2/k_3 + 1}. \quad (6)$$

Кроме этих величин, в псевдомолекулярных условиях при $[\text{S}] \ll K_{s(\text{как})}$ определяли также бимолекулярные константы скорости $k_{11} = k_2/K_s$, значение которых не зависит от лимитирующей скорости гидролиза стадии (табл. 1).

Для углеводородных групп $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}$, начиная с $n=3$, индукционные постоянные $\sigma^* = 0$, что соответствует модифицированной шкале этих величин, допускающей рассмотрение алкильных и электроотрицательных заместителей в рамках единой реакционной серии [9]. Стерические постоянные E_s выбраны, исходя из принципа изостерности, путем сравнения заместителей ОХ с группами CH_2X [10]. Константы гидрофобности π рассчитаны по литературным данным, согласно аддитивной схеме [11, 18].

Гидролиз неионных субстратов. Из рис. 1 видно, что бимолекулярные константы скорости гидролиза алкилацетатов с нормальными и разветвленными заместителями, в случае которых стерическое влияние можно считать одинаковым, описываются корреляционным уравнением

$$\lg k_{11} = \text{const} + \pi, \quad (7)$$

Результаты корреляционного анализа кинетических констант гидролиза неионных субстратов бутирилхолинэстеразой

Соединения из табл. 1	Уравнение	Определяемые константы и их значения	Коэффициент корреляции	Стандартное отклонение
1-3, 8-10	(7)	const = 0,24±0,17 φ = 1,56±0,09	0,994	0,124
1-3, 8-10, 16-23	(8)	const = 0,17±0,18 φ = 1,62±0,10 ρ* = 2,50±0,18	0,984	0,171
1-3, 8, 9, 18-23	(10)	ρK _s ⁰ = 0,00±0,20 φ ₀ = 0,80±0,11	0,919	0,164
1-3, 8, 9, 18-23	(13) ¹	const' = 0,31±0,19 φ _α = 0,73±0,20 ρ* = 2,20±0,30	0,964	0,115

где φ характеризует чувствительность реакционной серии к гидрофобному влиянию (результаты обработки данных см. в табл. 2). От этой прямой отклоняются точки для субстратов с алкильными заместителями, более длинными, чем *n*-бутильная группа. Это, очевидно, связано с ограниченной длиной гидрофобной области для связывания отщепляемой части субстратов на активной поверхности фермента. При этом не размещающаяся в этой области часть заместителя в гидрофобном связывании не участвует, о чем свидетельствуют близкие значения k_{11} для субстратов $\text{CH}_3\text{COO}(\text{CH}_2)_n\text{H}$ при $n=4-6$. Из рис. 1 также видно, что более длинные заместители достигают некоторой другой гидрофобной области, что является причиной дальнейшего повышения констант скорости.

Интересно, что две гидрофобные области, разделенные гидрофильным участком, проявляются также в реакциях обратимого ингибирования бутирилхолинэстеразы алкилборными кислотами $\text{H}(\text{CH}_2)_n\text{B}(\text{OH})_2$ [12] и необратимого ингибирования этого фермента фосфорорганическими соединениями $(\text{RO})(\text{CH}_2)_n\text{P}(\text{O})\text{SX}$ по данным работы [13] (рис. 2). В последнем случае одинаково с отщепляемой частью субстратов на активной поверхности фермента располагается заместитель RO фосфорильной части ингибиторов, что согласуется со стереохимическими представлениями о реакциях нуклеофильного замещения у карбонильного атома углерода и у тетраэдрического фосфора в активном центре фермента [14].

Отклонение точек для субстратов с электроотрицательными заместителями от соответствующей уравнению (7) прямой на рис. 1 связано с индукционным эффектом, так как между величинами этих отклонений, $\Delta \lg k_{11} = \lg k_{11} - \text{const} - \phi\lambda$, и индукционными постоянными σ' соблюдается линейная зависимость, проходящая через начало координат (рис. 3). Для получения этой зависимости необходимо учесть длину гидрофобной области связывания отщепляемой части субстратов. При этом, например, для групп $-\text{C}_2\text{H}_4\text{SC}_2\text{H}_5$ и $-\text{C}_3\text{H}_6\text{SC}_2\text{H}_5$ использовали эффективные π -константы, равные в обоих случаях 1,45, что характеризует гидрофобность заместителей на протяжении первых четырех атомов цепочки. Из данных рис. 3 следует, что такой учет особенностей строения активной поверхности фермента недостаточен в случае алифатических заместителей.

Таким образом, реакционную способность неионных субстратов можно описать двухпараметровым уравнением:

$$\lg k_{11} = \text{const} + \phi\lambda + \rho^*\sigma', \quad (8)$$

где ρ^* характеризует чувствительность реакции к индукционному влиянию (табл. 2). Следует, однако, добавить, что это уравнение справедливо толь-

ко при постоянстве стерического влияния. Как видно из табл. 1, это условие не соблюдается в случае ацетатов вторичных и третичных спиртов, для которых значения E_s значительно отрицательнее по сравнению с остальными ацетатами, включая и катионные субстраты. В связи с низкой активностью ацетатов вторичных и третичных спиртов определение кинетических констант удалось только для циклогексилацетата, в случае которого стерическое влияние скомпенсировано гидрофобностью. Используя значение k_{II} для этого субстрата, можно оценить константы уравнения

$$\lg k_{II} = \lg k_{II}^{\circ} + \varphi_{\pi} + \rho^* \sigma^* + \delta E_s, \quad (9)$$

$\delta = 2,5$ и $\lg k_{II}^{\circ} = 1,1$, так как систематические данные для проведения многопараметровой корреляции отсутствуют.

При анализе специфичности бутирилхолинэстеразы на стадиях нековалентного связывания (1) и ацетилирования фермента (2) мы принимаем константу скорости дезацетилирования k_3 одинаковой для всех ацетатов. В таком случае зависимость $k_{кат}$ от строения субстратов в табл. 1 отражает изменение k_2 , и по меньшей мере для менее активных соединений $k_2/k_3 \ll 1$. При этом $k_{кат} = k_2$ и $K_{s(кат)} = K_s$, что допускает их применение в корреляционном анализе. Из линейной зависимости $pK_{s(кат)}$ от π согласно уравнению

$$pK_s = pK_s^{\circ} + \varphi_b \pi, \quad (10)$$

следует, что условие $k_2 < k_3$ соблюдается в пределах погрешности эксперимента для всех неионных соединений, за исключением фенилацетата. Отклонение точки для этого субстрата от прямой на рис. 4 можно объяснить изменением стадии, лимитирующей скорость, так как при логарифмировании соотношения (6) получим:

$$pK_{s(кат)} = pK_s + \lg \left(\frac{k_2}{k_3} + 1 \right). \quad (11)$$

Исходя из $k_2/k_3 + 1$, вычисленного из отклонения точки для фенилацетата от прямой на рис. 4, и константы $k_{кат}$, получим для этого субстрата $k_2 = 2,6 \cdot 10^3 \text{ с}^{-1}$ и для реакции гидролиза ацетилфермента $k_3 = 8,4 \cdot 10^2 \text{ с}^{-1}$. Используя последнюю величину, можно показать, что соотношение $k_2/k_3 < 1$ действительно соблюдается для остальных неионных субстратов.

Так как эффективность нековалентного связывания субстратов в активном центре фермента зависит только от гидрофобности отщепляемой группы, эффекты индукционного и стерического влияний должны проявляться в реакции ацетилирования фермента, поскольку константы k_{II} , описываемые уравнением (9), являются комбинацией констант k_2 и k_3 . Кроме того, как видно из зависимости $k_{кат}$ ($=k_2$) от строения углеводородного радикала в отщепляемой части алкилацетатов, скорость реакционной стадии зависит также от гидрофобности субстратов (рис. 5) и общее корреляционное уравнение включает наряду с другими составляющими также член $\varphi_a \pi$:

$$\lg k_2 = \lg k_2^{\circ} + \varphi_a \pi + \rho^* \sigma^* + \delta E_s. \quad (12)$$

При постоянстве стерического эффекта это уравнение упрощается:

$$\lg k_2 = \text{const}' + \varphi_a \pi + \rho^* \sigma^* \quad (13)$$

и становится применимым для расчета параметров φ_a и ρ^* (табл. 2). Для оценки $\lg k_2^{\circ}$ и δ в уравнении (12) пользовались значением $k_{кат}$ для циклогексилацетата и константами φ_a и ρ^* из табл. 2. При таком расчете получается $\lg k_2^{\circ} \approx 1$ и $\delta \approx 2$. На рис. 4 и 5 опущены точки для субстратов, отщепляемая часть которых не размещается полностью в гидрофобной области активного центра бутирилхолинэстеразы. Как видно из табл. 1, значения $k_{кат}$ и $K_{s(кат)}$ для этих субстратов близки к соответствующим вели-

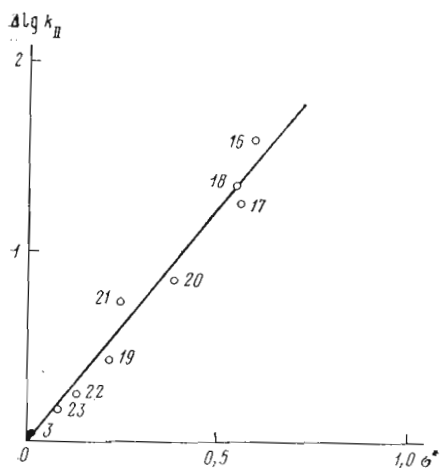


Рис. 3

Рис. 3. Зависимость $\Delta \lg k_{II} = \lg k_{II} - \text{const}$ — фл от σ^* в реакции катализируемого бутирилхолинэстеразой гидролиза неионных ацетатов CH_3COOX

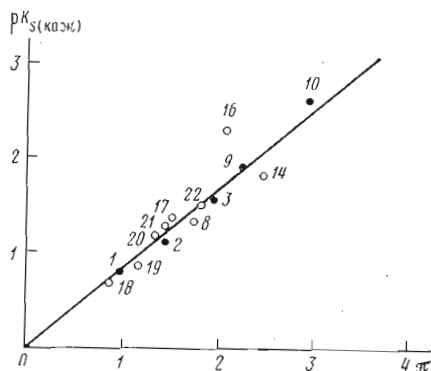


Рис. 4

Рис. 4. Связывание неионных субстратов CH_3COOX в активном центре бутирилхолинэстеразы. Номера соединений соответствуют табл. 1

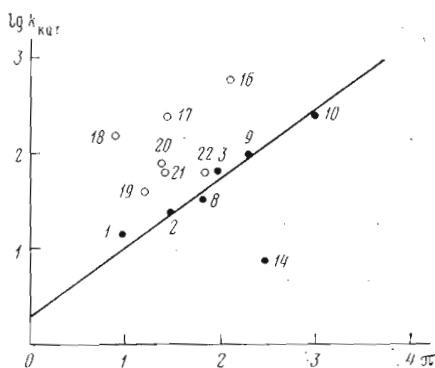


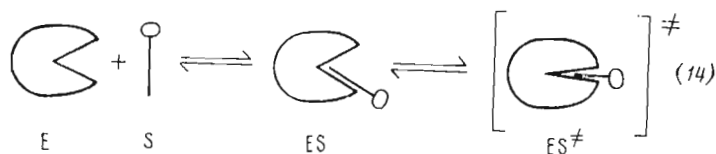
Рис. 5

Рис. 5. Влияние строения отщепляемой части субстратов CH_3COOX в реакции ацетилирования бутирилхолинэстеразы. Номера субстратов соответствуют табл. 1

чинам для *n*-бутилацетата, как это наблюдалось в случае k_{II} , и, следовательно, особенности топографии активной поверхности бутирилхолинэстеразы одинаково проявляются при связывании субстрата и в реакции ацетилирования фермента.

Член $\phi_{a\pi}$ в корреляционном уравнении для стадии ацетилирования бутирилхолинэстеразы свидетельствует о дополнительной стабилизации переходного состояния этой реакции гидрофобным взаимодействием. При этом вклады гидрофобного влияния в связывании и катализе равны, что видно из одинаковых в пределах точности определения значений констант ϕ_b и ϕ_a (табл. 2). Такое же влияние гидрофобности в каталитических стадиях было раньше обнаружено в реакциях α -химотрипсина [15, 16], ацетилхолинэстеразы [3], а также в реакции бутирилхолинэстеразы с алкилбутиратами [8]. В настоящее время нельзя однозначно решить, в чем заключается механизм такого возрастания реакционной способности фермент-субстратного комплекса (или ковалентного промежуточного соединения типа ацилфермента). Однако, исходя из симметрии проявления гидрофобности при связывании и катализе, была предложена гипотеза [16], согласно которой дополнительное гидрофобное взаимодействие в переходном состоянии является результатом конформационного изменения, которое заключается в «закрытии» гидрофобной полости активного центра фермента. При таком конформационном изменении имеет место дополни-

тельная сорбция заместителя и активационный барьер реакции снижается на вклад $\phi_{\text{л}}$, равный вкладу $\phi_{\text{г}}$. Это может быть проиллюстрировано следующей схемой [16]:



ES^{\ddagger} — активированный комплекс реакционной стадии.

Так как возмущение структуры белка при конформационном изменении увеличивает свободную энергию системы (соответствующий вклад является составляющей свободной энергии активации), в свободном и ацилированном ферментах более выгодна конформация с открытой гидрофобной «щелью» [16].

С вышеприведенными представлениями согласуются также данные, что не всякое гидрофобное взаимодействие в активном центре фермента приводит к стабилизации активированного состояния, а только взаимодействие заместителя с определенным гидрофобным участком может ускорить каталитическую стадию [8]. Возможно, что вышеуказанный процесс конформационного изменения белка связан с «приспособлением» белковой молекулы к новой конфигурации реакционного центра субстрата в активированном состоянии.

Таким образом, полученные данные позволяют количественно описать специфичность бутирилхолинэстеразы на всех стадиях реакции с неионными ацетатами. Обращает на себя внимание сходство полученных для бутирилхолинэстеразы зависимостей с соответствующими результатами для ацетилхолинэстеразы, изученной нами в этом плане ранее [3]. Можно отметить, что константы K_s для неионных субстратов в случае этих двух ферментов практически совпадают, а константы скорости ацетилирования и дезацетилирования (const и k_3) для ацетилхолинэстеразы на порядок больше соответствующих констант для бутирилхолинэстеразы. Кроме того, эти ферменты характеризуются также разными значениями параметров ρ^* и особенно δ , что свидетельствует, по-видимому, о неодинаковых условиях протекания реакции в активном центре этих ферментов.

Эффект анионного центра. Для учета дополнительного эффекта, связанного с появлением катионного заряда в отщепляемой части субстратов, исходили из уравнений (8), (10) и (13), вводя в них члены θ , θ_b и θ_a соответственно. Для бимолекулярной константы скорости справедливо соотношение

$$\lg k_{11} = \text{const} + \phi_{\text{л}} + \rho^* \sigma^* + \theta. \quad (15)$$

Из рис. 6 видно, что точки для катионных субстратов 25–30 (табл. 1) отклоняются от прямой в координатах $\lg k_{11} - \rho^* \sigma^*$ и π , полученной согласно этому уравнению для неионных субстратов. Эти отклонения, равные вкладу θ , не зависят от типа ониевого атома ($-\overset{+}{\text{N}}\equiv$ или $-\overset{+}{\text{S}}=$) и, следовательно, характеризуют взаимодействие катионного заряда заместителя с анионным центром фермента. При этом в случае заместителей $-(\text{CH}_2)_n\overset{+}{\text{N}}(\text{CH}_3)_3$ и $-(\text{CH}_2)_n\overset{+}{\text{S}}(\text{CH}_3)_2\text{C}_2\text{H}_5$ с $n \geq 2$ θ не зависит от длины полистиленовой цепочки, отделяющей катионную группу от реакционного центра субстратов, и имеет среднее значение $+9,5$. При $n=1$ получим для сульфониевого и аммониевого субстратов также близкие значения θ , равные 5,8 и 5,9 соответственно. Это, однако, меньше величины θ для остальной серии. Таким образом, в пределах изученной реакционной серии не

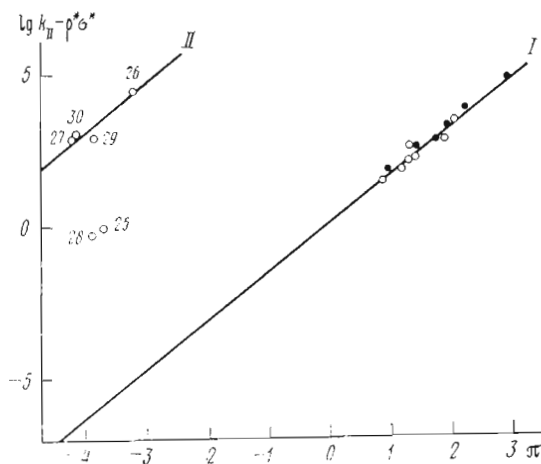


Рис. 6. Определение эффекта анионного центра в реакции бутирилхолинэстеразы с неионными (I) и катионными (II) субстратами (номера субстратов соответствуют табл. 1)

наблюдается четко выраженного максимума в зависимости θ от n , как следовало бы ожидать согласно классическим представлениям о роли анионного центра, заключающегося в электростатической стабилизации ES-комплекса, и о строении активной поверхности холинэстераз [2, 17].

Аналогичное влияние анионного центра проявляется также на стадиях пековалентного связывания

$$pK_s = pK_s^0 + \varphi_b \pi + \theta_b \quad (16)$$

и ацетилирования фермента:

$$\lg k_2 = \text{const}' + \varphi_a \pi + \rho^* \sigma^* + \theta_a \quad (17)$$

Используя для ацетилхолина значение констант $k_2 = 3,9 \cdot 10^3 \text{ с}^{-1}$ и $K_s = 5,9 \cdot 10^{-3} \text{ М}^{-1}$, которые вычислены из величин $k_{\text{кат}}$ и $K_{s(\text{кат})}$ в табл. 1 и вышеприведенного значения k_3 , получим $\theta_b = 4,8$ и $\theta_a = 4,2$.

Было показано, что появление катионного заряда на заместителе уменьшает его π -константу на 5,7 единиц [18]:

$$\pi_{\text{Г}^+} = \pi_{\text{Х}} - 5,7 \quad (18)$$

При этом можно ожидать, что уменьшается также эффективность взаимодействия катионного реагента с гидрофобным активным центром фермента, так как в корреляционных соотношениях, содержащих член π , появляется отрицательная составляющая $-5,7\varphi$, где φ характеризует гидрофобность фермента. В реакции бутирилхолинэстеразы с катионными реагентами этот отрицательный инкремент, однако, скомпенсирован вкладом θ_b , в результате чего активность катионных субстратов сравнима с активностью неионных соединений (см. табл. 1). Следует отметить, что такая же закономерность обнаружена в реакции ацетилхолинэстеразы с катионными субстратами [4] и при ингибировании обеих холинэстераз фосфор-

органическими соединениями $(\text{C}_2\text{H}_5\text{O})_2\text{P}(\text{O})\text{S}(\text{CH}_2)_n\overset{+}{\text{S}}(\text{CH}_3)\text{C}_2\text{H}_5$ с катионной группой в отщепляемой части [6, 8]. Во всех этих реакциях θ компенсирует уменьшение гидрофобности катионного заместителя, начиная с определенной длины полиметиленовой цепочки ($n \geq 1$), разделяющей опиевый атом и реакционный центр. Таким образом, компенсация «антигидрофобного» влияния катионного заряда заместителя, по-видимому, является основной функцией анионного центра в холинэстеразном катализе и это предоставляет ферменту возможность использовать гидро-

Глобное взаимодействие также при «узнавании» катионных реагентов [4, 6, 8].

Исходя из экстракционной модели гидрофобного взаимодействия, наблюдаемую в эксперименте компенсацию «антигидрофобного» влияния ониевого атома можно объяснить нейтрализацией положительного заряда заместителя отрицательной группой анионного центра фермента [6, 8], так как при этом в гидрофобном окружении находится формально незаряженный реагент. Также было высказано предположение [8], что анионная группа фермента располагается в водной среде вблизи гидрофобной полости активного центра и только при взаимодействии с катионным реагентом перемещается вместе с последним в эту гидрофобную «фазу». Такое расположение «анионного пункта» бутирилхолинэстеразы энергетически более выгодно, чем его фиксация в гидрофобном окружении, и согласуется со значением pK_a ионогенной группы анионного центра, которое близко к соответствующим значениям для карбоксильных кислот в водной среде [19].

Следует отметить, что гибкость полипептидной цепочки, содержащей анионную группу, объясняет также отсутствие зависимости θ от n и одинаковое проявление эффекта анионного центра в случае субстратов и фосфорорганических ингибиторов, хотя отщепляемые части этих реагентов располагаются неодинаково в активном центре. К этому можно добавить, что представление о конформационной лабильности полипептидной цепочки, содержащей анионный центр, использовалось также при объяснении pH-зависимости взаимодействия бутирилхолинэстеразы с фосфорорганическими ингибиторами [20] и нафталином [21]. С другой стороны, однако, возможности такой конформационной перестройки активной поверхности холинэстераз, по-видимому, недостаточны для обеспечения выгодного для протекания реакции расположения субстратов и ингибиторов с коротким расстоянием между катионной группой и реакционным центром, так как при $n=1$ (и даже $n=2$ [8]) «антигидрофобность» ониевого группы не компенсирована эффектом анионного центра.

О взаимосвязи закономерностей проявления анионного центра и гидрофобного взаимодействия в катализируемых холинэстеразой реакциях свидетельствует также одинаковое проявление этих эффектов на стадиях нековалентного связывания (1) и ацетилирования (2). При этом, однако, $\theta_a < \theta_b$, хотя $\varphi_a \approx \varphi_b$. Следует отметить, что разность θ_b и θ_a становится еще больше, если кинетические измерения провести в условиях более низкой ионной силы, так как при постоянстве $k_2(k_{\text{кат}})$ константа K_s в значительной степени зависит от концентрации добавленного в реакционную среду электролита [22]. Влияние электролитов на K_s можно объяснить тем, что вклад ион-ионного взаимодействия при образовании ионной пары с участием анионного центра фермента и катионного субстрата в стадии связывания зависит от ионной силы среды. Эта электростатическая составляющая входит, очевидно, в вычисляемое из уравнения (16) значение θ_b . Таким образом, для уточнения физического содержания θ_b и анализа его зависимости от ионной силы необходимы систематические данные о влиянии добавленных в реакционную среду электролитов на кинетические параметры катализируемых бутирилхолинэстеразой реакции. Работа для получения таких данных нами ведется.

Экспериментальная часть

Препарат бутирилхолинэстеразы сыворотки крови лошади (КФ 3.1.1.8) производства НИИ вакцин и сывороток им И. И. Мечникова использовали после дополнительной очистки на колонке с сефадексом G-200. Удельная активность полученного препарата фермента 600 нкат*.

* Кат – катал., единица ферментативной активности, соответствующая превращению 1 моль субстрата за 1 с.

Исходные растворы фермента готовили в 0,15 М КСl и хранили при 4°. Растворы фермента титровали методом Берри [23], используя О,О-диэтил-*n*-нитрофенилфосфат. Константы и методика очистки ингибитора приведены ранее [24].

Незаряженные ацетаты марки ч. или х.ч. использовали после ректификации, физические константы препаратов хорошо согласовались с данными таблицы [25]. Синтез и свойства сульфониевых субстратов $[\text{CH}_3\text{COO}(\text{CH}_2)_n\overset{+}{\text{S}}(\text{CH}_3)\text{C}_2\text{H}_5]\text{CH}_3\text{SO}_4^-$ и ацетилформохлинхлорида $[\text{CH}_3\text{COOCH}_2\overset{+}{\text{N}}(\text{CH}_3)_3]\text{Cl}^-$ описаны раньше [26]. Соединение $[\text{CH}_3\text{COO} \cdot (\text{CH}_2)_3\overset{+}{\text{N}}(\text{CH}_3)_3]\text{Cl}^-$ получали алкилированием триметиламина 3-хлорпропилацетатом [27], полученное вещество перекристаллизовали 3 раза из смеси абсолютного спирта и диэтилового эфира. В продукте определяли содержание хлора 18,20% (вычислено для брутто-формулы $\text{C}_8\text{H}_{18}\text{O}_2\text{NCl}$ 18,14%). Ацетилхолин иодистый марки ч.д.а. использовали без дополнительной очистки. Остальные реактивы — КОН и КСl марки о.ч.

Субстраты растворяли в 0,15 М КСl, в случае незаряженных веществ эти же растворы использовали в качестве реакционной среды. Водные растворы ацетатов имели нейтральный рН, и количество уксусной кислоты, освобождающейся при полном гидролизе субстратов, соответствовало вычисленной, исходя из концентрации растворов. Все растворы субстратов готовились непосредственно перед кинетическими измерениями.

Кинетические измерения проводили на рН-стате фирмы Radiometer (Дания, ТТТ1, SBR2, АВU1) титрованием кислоты, образующейся при ферментативном гидролизе субстратов 0,01 М раствором КОН. Условия реакции: рН 7,5; 0,15 М КСl, 25°. Для вычисления констант $k_{\text{нат}}$ и $K_{s(\text{нак})}$ использовали линейную трансформацию уравнения Михаэлиса (4) в двойных обратных координатах $1/v$ и $1/[S]$ (рис. 7). Для каждого субстрата проводили не меньше 8 измерений. Бимолекулярные константы скорости определяли в псевдомолекулярных условиях, где $[S] \ll K_{s(\text{нак})}$. При этом гидролиз доводили до практически полного израсходования субстрата в реакционной смеси и опыты повторяли при нескольких разных концентрациях фермента. Константы скорости первого порядка рассчитывали методом Рудакова [28] в координатах $\ln v$ и t согласно уравнению

$$\ln v = \ln [S]_0 + \ln k_1 - k_1 t, \quad (19)$$

где v — скорость реакции в момент времени t и $[S]_0$ — исходная концентрация субстрата. Бимолекулярную константу скорости k_{11} рассчитали из зависимости k_1 от $[E]$, так как $k_1 = k_{11}[E]$.

Расчеты и статистическую обработку данных проводили на ЭВМ «Напри-2».

ЛИТЕРАТУРА

1. Узбб Л. (1966) Ингибиторы ферментов и метаболизма, с. 195–310, «Мир», М.
2. Яковлев В. А. (1965) Кинетика ферментативного катализа, с. 138–242, «Наука», М.
3. Järvi J., Kesvatera T., Aaviksaar A. (1976) Eur. J. Biochem., **67**, 315–322.
4. Järvi J., Kesvatera T., Aaviksaar A. (1976) Organic Reactivity (Tartu), **13**, 501–506.

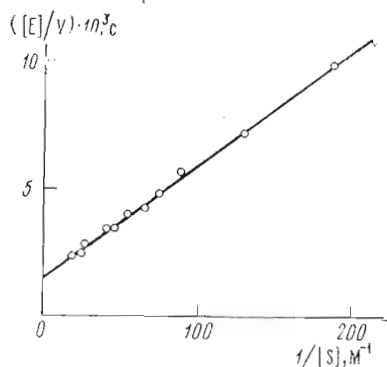


Рис. 7. Определение кинетических параметров гидролиза *n*-бутил-ацетата бутирилхолинэстеразой

5. Ярв Я. Л., Аавиксаар А. А., Годовиков Н. Н., Лобанов О. И. (1976) Биоорган. химия, 2, 978-985.
6. Ярв Я. Л., Аавиксаар А. А., Годовиков Н. Н., Лобанов О. И. (1977) Биоорган. химия, 3, 268-272.
7. Нуммова Н. Д., Аавиксаар А. А., Богатков С. В. (1977) Биоорган. химия, 3, 1401-1405.
8. Langel U., Järv J. (1976) Biochim. et biophys. acta, 525, 122-133.
9. Пальм В. А., Пюсса Т. О., Нуммерт В. М., Тальвик И. В. (1973) Реакц. способн. орган. соедин., 10, 243-267.
10. Тальвик И. В., Пальм В. А. (1971) Реакц. способн. орган. соедин., 8, 445-462.
11. Leo A., Hansch C., Elkins D. (1971) Chem. Revs., 71, 525-616.
12. Ярв Я. Л., Сизэк М. А., Лангель Ю. Л., Ротанова Т. В. (1978) Биоорган. химия, 4, 1364-1371.
13. Kabachnik M. I., Brestkin A. P., Godovikov N. N., Michelson M. J., Rozengart E. V., Rozengart V. I. (1970) Pharmacol. Rev., 22, 355-388.
14. Järv J., Aaviksaar A., Godovikov N., Lobanov D. (1977) Biochem. J., 167, 823-825.
15. Berezin I. V., Kazanskaya A. A., Klyosov A. A., Martinck K. (1971) FEBS Lett., 15, 125-128.
16. Aaviksaar A., Paris J., Palm V. (1974) Organic Reactivity (Tartu), 8, 817-832.
17. Bergmann F. (1958) Advances in Catalysis and Related Subjects, 10, 130-164.
18. Сикк П., Аавиксаар А., Абдувахабов А. (1977) Изв. АН ЭССР. Сер. «Химия-геология», 26, 242-244.
19. Лангель Ю. Л., Ярв Я. Л. (1978) Биоорган. химия, 4, 1352-1357.
20. Langel U., Järv J. (1978) Biochim. et biophys. acta, 526, 450-456.
21. Лангель Ю. Л., Ярв Я. Л. (1978) Реакц. способн. орган. соедин., 15, 456-463.
22. Бресткин А. П., Брик И. Л., Волкова Р. И., Майзель Е. Б., Розенгарт Е. В. (1970) Биохимия, 35, 382-392.
23. Berry W. K. (1951) Biochem. J., 49, 615-620.
24. Ярв Я. Л., Аавиксаар А. А., Годовиков Н. Н., Лангель Ю. Л., Пасть У. Е. (1976) Биохимия, 41, 827-835.
25. Dictionary of Organic Compounds (1946) Heilbron I., Bunbury H., eds, vol. 1-3, 2nd edn., Eyre, London.
26. Ярв Я. Л. (1976) Канд. дис., Тарту.
27. Renshaw R. R., Ware J. C. (1925) J. Amer. Chem. Soc., 47, 2990-2998.
28. Рудаков Е. С. (1960) Кинетика и катализ, 1, 177-187.
29. Коппель Н. А., Карельсон М. М., Пальм В. А. (1973) Реакц. способн. орган. соедин., 10, 497-514.
30. Ярв Я. Л., Аавиксаар А. А., Годовиков Н. Н., Морозова Н. А. (1972) Реакц. способн. орган. соедин., 9, 813-829.
31. Hansch C., Leo A., Unger S. H., Kim K. H., Lien E. J. (1973) J. Med. Chem., 16, 1207-1216.

Поступила в редакцию
12.X.1978

SUBSTRATE LEAVING GROUP EFFECTS IN THE BUTYRYLCHOLINESTERASE CATALYZED REACTIONS

JÄRV J. L., LANGEL Ü. L.

Tartu State University, Tartu

The kinetics of the butyrylcholinesterase catalyzed hydrolysis of the acetic esters CH_3COOX have been studied, wherein the leaving portion comprises hydrocarbon, non-ionic electronegative and cationic substituents. This made possible characterizing the active site topography and enzyme specificity at the stages of non-covalent binding and acyl enzyme formation. Apart from the inductive and steric effects, the hydrophobicity of the substituents also affected the catalytic steps. For cationic substrates, the increments due to the anionic center were calculated and possible kinetic manifestation of the latter discussed. The results corroborated the view that the main role of the anionic center in determining the cholinesterase specificity is to compensate the cationic substituent «antihydrophobicity» and unfavorable interactions associated with the substrate charged group in the hydrophobic region of the enzyme active site. The analysis performed allowed to determine the deacetylation rate constant.